

**Hypoxische Regulation der matrizellulären CCN-Proteine
CYR61 (CCN1) und NOV (CCN3) durch HIF-1 α und TGF- β 3
im humanen Trophoblasten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Nadine Wolf

aus Oberhausen

Oktober 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Fandrey

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die humane Plazenta.....	1
1.1.1	Aufbau der humanen Plazenta.....	1
1.1.2	Trophoblastinvasion	2
1.1.3	Plazenta-assoziierte Schwangerschaftserkrankungen	5
1.1.4	Präeklampsie.....	5
1.1.4.1	Epidemiologie der Präeklampsie	7
1.1.5	Das humane plazentare Explant-Modell	8
1.1.6	Die maligne Trophoblast-Zelllinie JEG3	9
1.2	Die CCN-Familie	10
1.2.1	CYR61	11
1.2.2	NOV	14
1.3	Hypoxie und HIF-1α	16
1.3.1	Hypoxie-regulierte Signalwege	17
1.3.2	Hypoxie-regulierte Faktoren in der humanen Plazenta	18
1.3.3	Hypoxie und Präeklampsie.....	19
1.4	TGF-β3	20
1.5	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Plastikgefäße und Einwegartikel	23
2.1.2	Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3	Antikörper.....	25
2.1.4	Oligonukleotide	26
2.1.5	Plazentagewebe	26
2.1.6	Zelllinie.....	26
2.1.7	Geräte	27

2.1.8	Software und Server	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellbiologische Methoden	28
2.2.1.1	Erstellung von humanen plazentaren Explant Kulturen	28
2.2.1.2	Einbetten der plazentaren Explants.....	29
2.2.1.2.1	Paraffin-Gewebeeinbettung.....	29
2.2.1.2.2	Kryo-Gewebeeinbettung	29
2.2.1.3	Immunhistochemie der plazentaren Explants	30
2.2.1.3.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffin-Schnitten.....	30
2.2.1.3.2	Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten.....	30
2.2.1.3.3	Immunhistochemie an Kryoschnitten.....	31
2.2.1.4	Kultivierung der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3	31
2.2.1.5	Passagieren von Chorionkarzinomzellen	32
2.2.1.6	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CasyCounter	32
2.2.1.7	Einfrieren von Chorionkarzinomzellen.....	32
2.2.1.8	Inkubation der JEG3-Zellen unter hypoxischen Bedingungen	33
2.2.1.9	Immunzytochemie.....	33
2.2.1.10	Kultivierung der JEG3-Zellen mit DMOG	34
2.2.1.11	Inkubation der JEG3-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α	35
2.2.1.12	Behandlung der JEG3-Zellen mit rekombinantem TGF- β 3	36
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus plazentaren Explants.....	36
2.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien.....	37
2.2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.2.4	Reverse Transkription.....	37
2.2.2.5	PCR.....	38
2.2.2.6	DNA-Gelelektrophorese	39
2.2.2.7	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	39
2.2.2.8	Quantitative Real-time PCR.....	39
2.2.3	Biochemische Methoden	40
2.2.3.1	Proteinextraktion aus Primärgewebekulturen	40
2.2.3.2	Proteinextraktion aus Zelllinien	41
2.2.3.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	41
2.2.3.4	SDS-PAGE.....	41

2.2.3.5	Western Blot	42
2.2.3.6	Antikörper-Inkubation	43
2.2.3.7	Statistische und densitometrische Auswertungen der Expressionsdaten	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Regulation der matrizellulären CCN-Proteine CYR61 und NOV im humanen Trophoblasten	44
3.1.1	Untersuchungen zur Regulation von CYR61 und NOV anhand des humanen plazentaren Explantmodells	44
3.1.1.1	Etablierung des humanen plazentaren Explantmodells	44
3.1.1.2	Makro- und mikroskopische Analyse der plazentaren Explants	45
3.1.1.3	Untersuchungen zur Lokalisation von CYR61 und NOV in humanen plazentaren Explants	46
3.1.1.4	Sauerstoff-abhängige Regulation von CYR61 und NOV in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters	48
3.1.2	Untersuchungen zur hypoxischen Regulation von CYR61 und NOV in der humanen Trophoblast-Zelllinie JEG3	51
3.1.2.1	Lokalisationsuntersuchungen von CYR61 und NOV in JEG3-Trophoblastzellen unter 20% O ₂ und Hypoxie	51
3.1.2.1.1	Reaktivität des Zellkultursystems auf das hypoxische Milieu	52
3.1.2.1.2	Expressionsuntersuchungen von CYR61 und NOV unter Hypoxie	54
3.1.2.2	Die Regulation von CYR61 und NOV ist von HIF-1 α abhängig	56
3.1.2.2.1	Nachweis der Reaktivität der JEG3-Zellen auf DMOG	57
3.1.2.2.2	Bestimmung der CYR61- und NOV-Expression unter dem Einfluss von DMOG	58
3.1.2.3	Die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV erfolgt über HIF-1 α	61
3.1.2.3.1	Ermittlung der Transfektionseffizienz von siRNAs in JEG3-Zellen	61
3.1.2.3.2	Nachweis der Effizienz des HIF-1 α Silencing	61
3.1.2.3.2	Ermittlung der CYR61 und NOV Expression unter dem Einfluss von siRNAs gegen HIF-1 α	62
3.1.2.4	TGF- β 3 ist in die CYR61- and NOV-Regulation unter Hypoxie involviert	65
3.1.2.4.1	Analyse der CYR61- und NOV-Regulation durch den Einfluss von rekombinantem TGF- β 3 unter Hypoxie	66

4	DISKUSSION	69
4.1	CYR61 und NOV werden in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters durch die Sauerstoffkonzentration reguliert und sind möglicherweise an der Trophoblastinvasion beteiligt.	70
4.1.1	Anstieg der CYR61- und NOV-Expression in plazentaren Explants des ersten Trimesters	70
4.2	CYR61 und NOV werden durch Hypoxie in der Trophoblast-Zelllinie JEG3 reguliert	72
4.2.1	Hypoxie bewirkt eine Lokalisationsänderung von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen	72
4.2.2	HIF-1 α und TGF- β 3 beeinflussen die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen	74
4.2.2.1	Die Expression der intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine wird durch HIF-1 α gesteuert	74
4.2.2.2	Die CYR61- und NOV-Sekretion wird durch Hypoxie, jedoch unabhängig von HIF-1 α , gesteuert	76
4.2.2.3	TGF- β 3 ist in die Regulation von CYR61 und NOV unter Hypoxie involviert	78
4.2.2.4	Einfluss von sekretiertem CYR61 und NOV auf die Trophoblastinvasion und mögliche Signalwege	80
4.3	Einfluss von CYR61 und NOV in der Pathogenese der Präeklampsie	82
4.4	Ausblick.....	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	LITERATURVERZEICHNIS	86
7	ANHANG	107
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	107
7.2	Abbildungsverzeichnis	110
7.3	Tabellenverzeichnis	111

8	DANKSAGUNG	112
9	LEBENS LAUF	113
10	ERKLÄRUNG	115

1 Einleitung

1.1 Die humane Plazenta

Die humane hämochoriale Plazenta stellt eine komplexe und dynamische Schnittstelle zwischen embryonalem und maternalem Gewebe dar und reguliert die intrauterine Entwicklung des Embryos. Dabei nimmt sie viele verschiedene Funktionen ein, zu denen der Schutz des Embryos vor dem maternalen Immunsystem, die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, und die Weiterleitung von toxischen Stoffwechselprodukten vom Embryo zur Mutter gehören. Die Versorgung des Embryos und die Ableitung von toxischen Substanzen kann durch die Modulation des maternalen arteriellen Gefäßsystems gewährleistet werden, welche durch die Invasion plazentarer Zellen in das maternale Gewebe, die Dezidua, erfolgt (Fisher et al., 2004). Diese Zellen modifizieren und erweitern die Spiralarterien der Mutter, so dass ein erhöhter Blutfluss mit geringerem Widerstand die Folge ist (s. 1.1.2). Um die Aufrechterhaltung einer gesunden Schwangerschaft zu gewährleisten, synthetisieren und sekretieren die plazentaren Zellen Hormone wie z.B. Östrogen und Progesteron in die maternale Blutzirkulation, wodurch der maternale Metabolismus zum Vorteil des Embryos beeinflusst wird (Georgiades et al., 2002). Die Sekretion des Hormon hPL (*human placental lactogen*) in die maternale und fötale Blutzirkulation stimuliert z.B. die IGF (*insulin-like growth factor*) -Produktion und moduliert den Metabolismus, welches zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Glukose und Aminosäuren für den Fötus führt (Handwerger et al., 2000).

1.1.1 Aufbau der humanen Plazenta

Die Begrenzung der Plazenta zur Amnionhöhle bildet die fötale Chorionplatte, in der sich die fötalen umbilikalen Gefäße verzweigen und in die von der Chorionplatte ausgehenden Zottenbäume abzweigen (Leiser und Kaufmann, 1994). Die gegenüberliegende Begrenzung bildet die Dezidua basalis, bestehend aus dezidualisierten endometrialen Zellen und verschiedenen Arten von Immunzellen, zu denen Makrophagen, granuläre Lymphozyten und NK (*natural killer*) -Zellen gehören (Moffett-King, 2002; Sanguansermsri und Pongcharoen, 2008). Der Raum zwischen Chorionplatte und Dezidua basalis, der intervillöse Raum, wird von maternalem Blut durchströmt und ist durch komplex verzweigte Zottenbäume ausgefüllt, welche die Hauptkomponente in der Plazenta darstellen. Manche der villösen Zotten sind

nicht in direktem Kontakt mit der Dezidua, andere sind als sog. Stammzotten an die Dezidua angelagert (s. Abb. 1.1). Die Chorion-Zotten, welche in ihrem Inneren aus einer Matrix aus mesenchymalen Zellen und fötalen Blutgefäßen bestehen, sind von einer epithelialen Trophoblast-Doppelschicht umgeben (s. Abb. 1.2). Diese Doppelschicht besteht aus den innen gelegenen Zytotrophoblastzellen und den außen gelegenen Synzytiotrophoblastzellen. Die Synzytiotrophoblastzellen formen die epitheliale Oberfläche der villösen Zotten und sind von maternalem Blut umgeben. Sie sekretieren u.a. Hormone wie hCG (*human chorionic gonadotropin*) und hPL (Lunghi et al., 2007). Die villösen Zytotrophoblastzellen proliferieren während der gesamten Schwangerschaft und fusionieren zu Synzytiotrophoblastzellen. Im Laufe der Schwangerschaft nimmt der Anteil an Zytotrophoblastzellen zunehmend ab. Der dritte Trophoblastzelltyp ist der nicht-proliferative, extravillöse Trophoblast (EVT), welcher in die Dezidua invadiert (Kaufmann und Burton, 1994). Die EVT-Zellen sind differenzierte Zytotrophoblastzellen, die durch die synzytiale Zellschicht ausbrechen und in das uterine Stroma als sog. Zellsäulen invadieren (Lunghi et al., 2007).

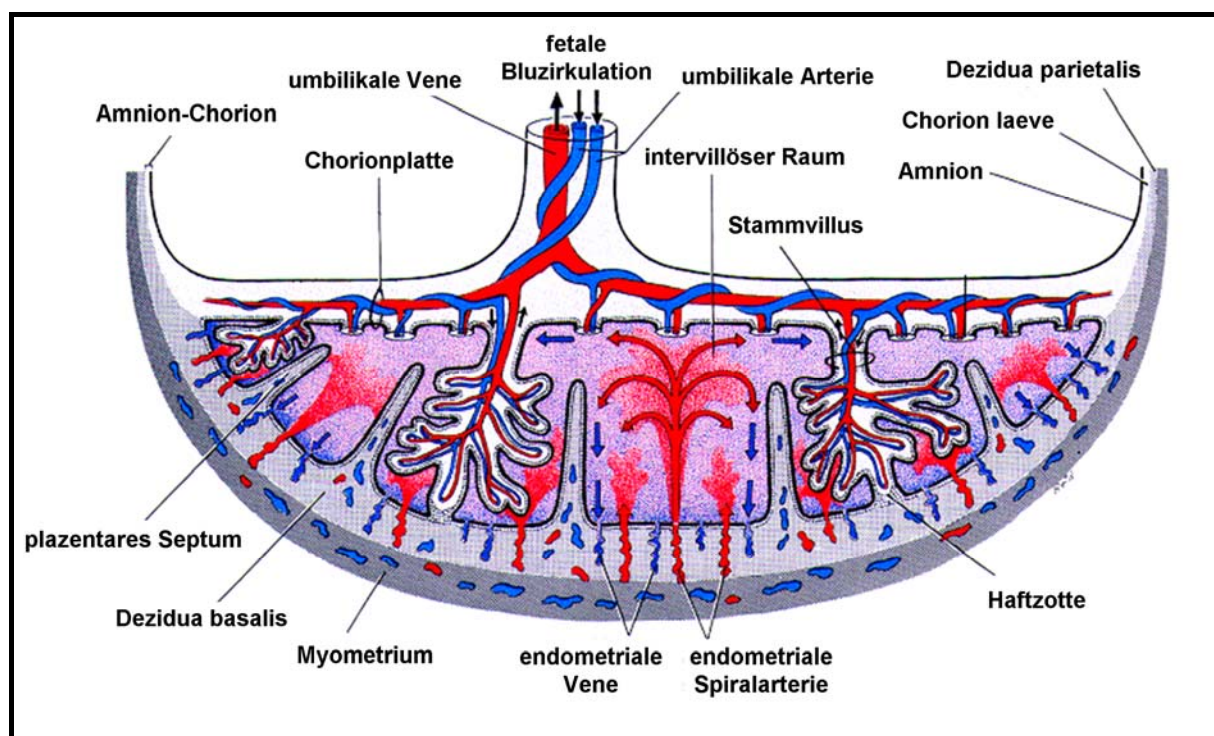


Abb. 1.1: Aufbau der humanen Plazenta. (verändert nach Gray, 2004)

1.1.2 Trophoblastinvasion

Die Invasion der EVT-Zellen in die Dezidua ist abhängig von vielen verschiedenen Faktoren und wird u.a. von der Sauerstoffkonzentration in der Plazenta gesteuert (Genbacev et al.,

1996, 1997). Während der frühen Schwangerschaft des ersten Trimesters - die Schwangerschaft ist in drei Trimester aufgeteilt und dauert im Normalfall 40 Wochen (1. Trimester: 1.-13. Schwangerschaftswoche (SSW); 2. Trimester: 14.-27. SSW; 3. Trimester: 28.-40. SSW) - findet die Trophoblastdifferenzierung in einer Umgebung mit physiologischer Hypoxie (1-3% O₂) statt (Rodesch et al., 1992; Jauniaux et al., 2000). Diese Hypoxie ist für die normale fötale und plazentare Entwicklung essentiell (Jauniaux et al., 2006; Cartwright et al., 2007), da der Fötus nur einen geringen Schutz gegen Sauerstoff-generierte Radikale aufweist (Caniggia et al., 1999). Zwischen der 10. und 12. SSW, wenn sich das maternale Blut in den intervillösen Raum ergießt, steigt der Sauerstoffgehalt an. Diese Erhöhung korreliert mit der Zeit der maximalen Trophoblastinvasion, während dessen die EVT-Zellen Zugang zu den maternalen Spiralarterien erhalten und diese zu Gefäßen mit einem geringeren Widerstand und einer erhöhten Durchflussleistung des Blutstroms transformieren. Die EVT-Zellen, welche aus den Zytotrophoblasten hervorgehen, brechen aus dem Zellverband aus und wandern in Form von Zellsäulen in das Uterusstroma ein. Ausgehend von der Spitze der Zellsäule migrieren die Zellen zum Einen lateral um die „Trophoblast-shell“ zu bilden und zum Anderen longitudinal um tief in die Dezidua und später in das Myometrium zu invadieren, um die Endothelzellen der uterinen Spiralarterien als sog. endovaskulärer Trophoblast zu ersetzen (Brosens et al., 2002; Loregger et al., 2003) (s. Abb. 1.2).

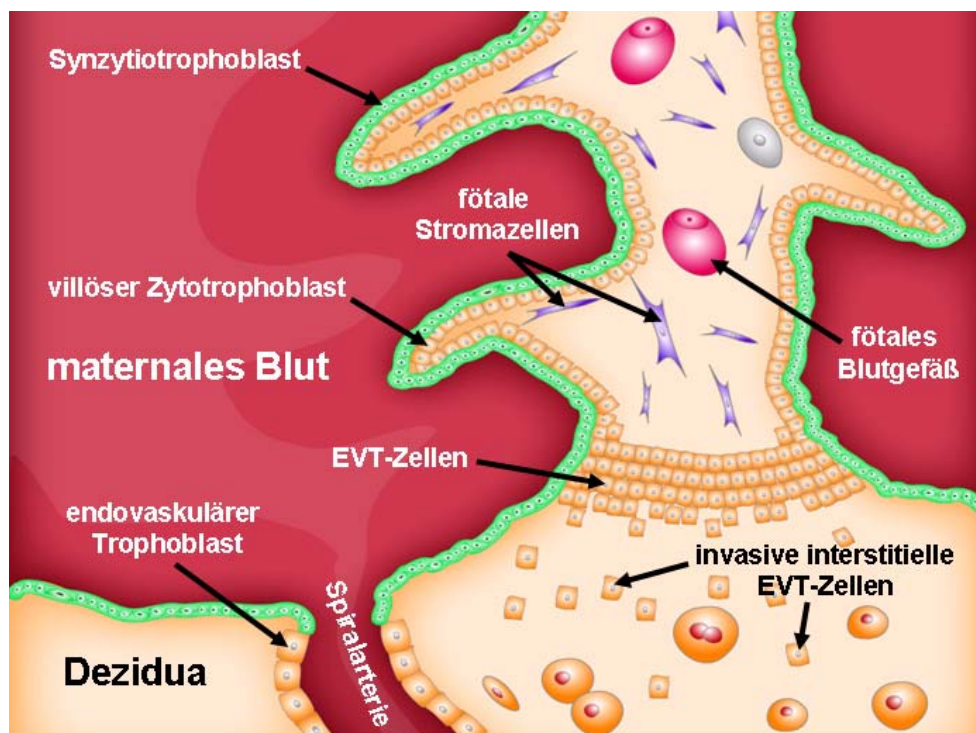


Abb. 1.2: Schema der Trophoblastinvasion. Schematischer Querschnitt einer Stammzotte. (verändert nach Kibschull et al., 2008)

Bei der Gefäß-Umgestaltung werden zunächst die glatten Muskelzellen der Spiralarterien zerstört und die EVT-Zellen, welche nun einen endothelialen Phänotyp annehmen, invadieren in das Lumen der Spiralarterien, wo sie die Endothelzellen ersetzen und somit das Gefäßlumen erweitern (Zhou et al., 1997a). Die Invasion der EVT-Zellen in die endometrialen Gefäße erfolgt ab der 8. SSW, wogegen die Invasion in die myometrialen Arterien erst ab der 14. SSW beginnt (Matijevic et al., 1995).

Es gibt verschiedene positive Regulatoren der Trophoblastinvasion, zu denen u.a. die EGF-Rezeptor-bindenden Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor- β*) gehören, sowie IGF-II und IL-1 (*interleukin-1*) (Bass et al., 1994; Librach et al., 1994; Irving und Lala, 1995a). Die Trophoblastinvasion und die Differenzierung des Zytotrophoblasten entlang des invasiven Signalweges beinhalten eine Änderung der Oberflächen-Integrine, eine Änderung des Zell-Phänotyps zu einem endovaskulären Adhäsions-Phänotyp, Pseudovaskulogenese genannt, und die Produktion von Fibronectin, welches durch TGF- β reguliert wird (Caniggia et al., 2000a; Damsky et al., 1992, 1994; Bischof et al., 1993). Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, Zelloberflächen-Rezeptoren, welche an die extrazelluläre Matrix (EZM) oder an Rezeptoren anderer angrenzender Zellen mit Hilfe von zweiwertigen Kationen binden können (Xiong et al., 2003). Die Bindung von Liganden an Integrine initiiert verschiedene Signalkaskaden und die Bildung von Zell-Matrix-Adhäsions-Komplexen (Schuppan und Ocker, 2003). Integrine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Zell-Prozessen, zu denen u.a. Adhäsion, Migration, Proliferation und die Homöostase der Zelle gehören (Lau und Lam, 1999; Yamada et al., 2003). Wenn die Trophoblasten die Zellsäulen verlassen und in die Dezidua einwandern, exprimieren sie den $\alpha_1\beta_1$ -Collagen/Laminin-Rezeptor und den $\alpha_5\beta_1$ -Fibronectin-Rezeptor. Die $\alpha_6\beta_4$ -Integrine können dann nicht mehr detektiert werden und die E-Cadherin-Expression, ein Adhäsionsprotein, ist stark vermindert (Damsky et al., 1992). Zudem konnte eine Beteiligung von Angiopoietin und deren Rezeptor Tie-2 nachgewiesen werden, welche die Proliferation und Migration von EVT-Zellen stimulieren (Dunk et al., 2000). Die EVT-Zellen regulieren MMPs (*Matrix-Metallo-Proteinasen*), $\alpha_1\beta_1$ -Integrine, VE-Cadherin, HLA (*human leukocyte antigen*)-C, -E und -G hoch, wobei HLA-G wahrscheinlich die Abstoßung des Fötus verhindert (Librach et al., 1994; Lyall et al., 2001). Interstitielle Trophoblastzellen migrieren in das Myometrium und fusionieren zu den multinukleären Trophoblast-Riesenzellen (Moffett-King, 2002), welche, im Gegensatz zu malignen Trophoblastzellen, ihre Migrations- und Invasionsfähigkeit verlieren. Ihre veränderte Funktion wird als Schutzmechanismus verstanden, um eine tiefere Invasion der Zellen in das Myometrium zu verhindern. Neben den positiven Faktoren, gibt es negative Regulatoren wie TGF- β_3 , welcher die Trophoblast-

invasion inhibiert. Bei normalen Schwangerschaften ist dieser Wachstumsfaktor zu Beginn der Schwangerschaft stark exprimiert und ist, bevor die Trophoblastzellen beginnen in die Dezidua zu invadieren, an der Veränderung des Trophoblasten-Phänotyps beteiligt. Nach der Differenzierung der Trophoblastzellen zu einem invasiven Phänotyp kann die TGF- β 3-Expression kaum noch nachgewiesen werden (Ando et al., 1998; Caniggia et al., 1999).

1.1.3 Plazenta-assoziierte Schwangerschaftserkrankungen

Eine Fehlregulation der komplexen Vorgänge während der Plazenta-Entwicklung in dem ersten Trimester der Schwangerschaft führt zu verschiedenen Pathologien, die ein Drittel aller Schwangerschaftserkrankungen ausmachen (Jauniaux et al., 2006). Präeklampsie (PE) (s. 1.1.4), IUGR (*intrauterine growth restriction*), Spontanaborte und Frühgeburtlichkeit sind Plazenta-assoziierte Schwangerschaftserkrankungen, wobei die PE und der Spontanabort die am meisten verbreiteten Erkrankungen darstellen (Krebs et al., 1996; Desoye, 2003; Jauniaux et al., 2006). Neben der Erkrankung während der Schwangerschaft sind plazentare Defekte auch mit Erkrankungen im Erwachsenenalter assoziiert. Herzmuskelerkrankungen, Schlaganfall, erhöhter Blutdruck oder Diabetes sind Folge eines beeinträchtigten Wachstums und einer beeinträchtigten Entwicklung während der fötalen und Kleinkind-Phase (Barker und Clark, 1997).

1.1.4 Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsbedingte Erkrankung, welche mit einer Häufigkeit von 3-5% eine der Hauptursachen für embryonale und maternale Mortalität darstellt (WHO, 2005; Maynard et al., 2008). Es ist bekannt, dass über 60.000 Frauen jährlich an dieser Erkrankung sterben (WHO, 2005) und es die Hauptursache für induzierte Frühgeburten darstellt (Redman und Sargent, 2005). Die maternalen Symptome der Erkrankung, die vor allem Bluthochdruck und eine Dysfunktion der Niere, welche durch Proteinurie gekennzeichnet ist, umfassen, entstehen zumeist am Ende des zweiten Trimesters der Schwangerschaft. Der Schwangerschafts-Bluthochdruck ist durch einen systolischen Wert von ≥ 140 mm Hg und/oder einen diastolischen Wert von ≥ 90 mm Hg definiert (Brown et al., 2001), sofern diese nach der 20. SSW bei zuvor gesunden Frauen auftreten. Die Proteinurie wird durch einen Wert von ≥ 300 mg/24 h definiert. Zu den Symptomen gehören zudem

häufig eine Wachstumsretardierung und eine verringerte Fruchtwassermenge auf Grund einer plazentaren Insuffizienz (Brown et al., 2001; Sibai et al., 2003). Es wird zwischen einer „early-onset“ Präeklampsie, welche mit schwerwiegenden Symptomen einhergeht (Vatten und Skjaerven, 2004), mit Beginn vor der 34. SSW, und einer „late-onset“ Präeklampsie, mit Beginn nach der 34. SSW, unterschieden (Redman und Sargent, 2005). Die bisher bekannten Therapieformen zielen auf die maternalen Symptome der Erkrankung ab. Bei schwerwiegenden Fällen ist die einzige effektiv angewandte Methode, um das Überleben des Embryos und der Mutter zu garantieren, die sofortige Einleitung der Geburt. Obwohl die molekularen Mechanismen dieser Erkrankung bis heute nicht geklärt sind, scheint die Plazenta eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Präeklampsie zu spielen, da die Präeklampsie auch bei Abwesenheit des Fötus, wie bei der molaren Schwangerschaft, auftritt (Chun et al., 1964; Myatt et al., 2002). Die bevorzugte Theorie zur Pathogenese der Präeklampsie ist eine mangelnde Invasion der Trophoblastzellen in die Dezidua und in die maternalen Spiralarterien. Die Umgestaltung der Spiralarterien scheint in der präeklampsischen Plazenta gestört zu sein, welches eine Unterversorgung des Embryos zur Folge hat (Brosens et al. 1970). Auf Grund der gestörten Trophoblastinvasion sind viele Komponenten, die an der Regulation der Invasions- und Differenzierungsprozesse involviert sind, verändert. Verschiedene Studien konnten die fehlregulierte Invasion beschreiben und die abnormalen Veränderungen konnten in zwei Gruppen unterteilt werden: (1) Die Invasion der EVT-Zellen in das uterine Stroma ist eingeschränkt und die Invasion in das maternale Gefäßsystem findet nicht bis in das Myometrium statt (Zhou et al., 1993; Brosens et al., 2002). Auf Grund dessen erfahren die maternalen Gefäße keine vollständige physiologische Umgestaltung. Dieses führt zu Gefäßen mit einem Durchmesser, der weniger als die Hälfte der Gefäße einer normalen Schwangerschaft aufweist (Brosens et al., 1972; Gerretsen et al., 1981; Moodley und Ramsaroop, 1989) (s. Abb. 1.3). (2) Die Anzahl der Spiralarterien, welche erkennbar invadierte Trophoblastzellen aufweisen, ist vermindert (Khong et al., 1986). Die Erkenntnisse werden durch den in der Präeklampsie diagnostizierten reduzierten uteroplazentaren Blutfluss unterstützt (Lunell et al., 1982). Die Tatsache, dass die Trophoblastzellen nur unzureichend in das maternale Kompartiment einwandern, kann u.a. auf den, in der Präeklampsie beobachteten, unreifen Phänotyp zurück geführt werden (Redline und Patterson, 1995). So konnte nachgewiesen werden, dass die Trophoblastzellen präeklampsischer Plazenten verschiedene Veränderungen, die zu einem invasiven, endothelialen Phänotyp führen, nicht durchlaufen (Caniggia et al., 1999): (1) Die Änderung der Oberflächen-Integrine von α_5 -positiven zu α_1 -positiven Zellen findet nicht statt (Zhou et al., 1993), (2) es erfolgt keine Pseudovaskulogenese (Zhou et al., 1997b), (3) präeklampsische

Plazenten weisen eine erhöhte Expression von Fibronektin auf, ein Kennzeichen für den unreifen Trophoblast-Phänotyp (Kupferminc et al., 1995) und (4) eine erhöhte TGF- β 3-Expression, welcher die Trophoblastinvasion inhibiert (Caniggia et al., 1999).

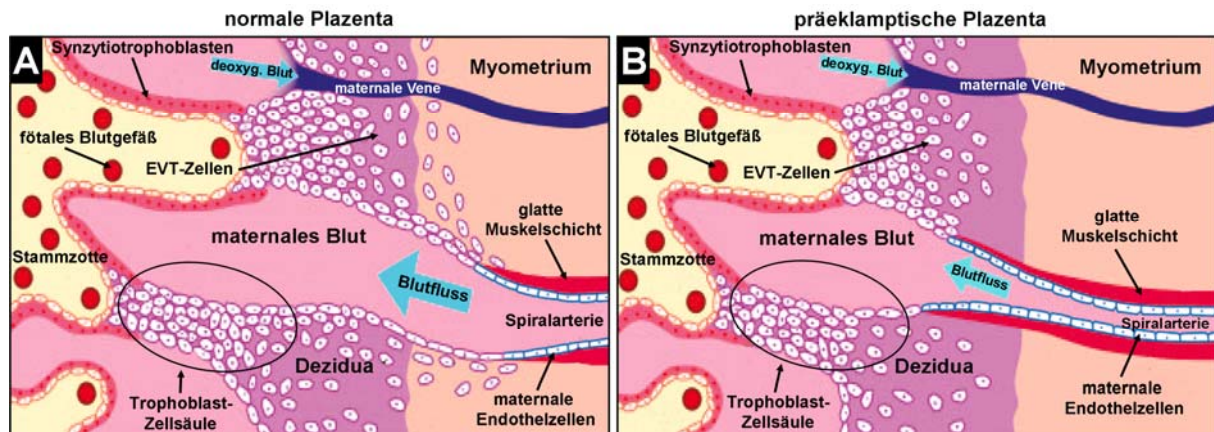


Abb. 1.3: Schema der Trophoblastinvasion in der normalen (A) und der präeklampsischen Plazenta (B). (verändert nach Lam et al., 2005).

1.1.4.1 Epidemiologie der Präeklampsie

Die Wahrscheinlichkeit an einer Präeklampsie zu erkranken liegt bei erstgebärenden Frauen zwischen 2% und 7%. Die Auswirkungen der Erkrankung verlaufen meistens mild und der Ausbruch der Erkrankung geschieht nahe der Geburt oder intrapartum (75% der Fälle) (Sibai et al., 2005). Es gibt viele verschiedene Faktoren, die das Risiko einer Präeklampsie erhöhen. Die Frequenz und die Schwere der Erkrankung sind höher bei Frauen mit Mehrfachgeburten (Sibai et al., 2000; Wen et al., 2004), chronischem Bluthochdruck (Sibai, 2002), vorhergehende Präeklampsie (Hnat et al., 2002), prägestationale Diabetes mellitus (Caritis et al., 1998), und bereits existierende Neigung zur Thrombosenbildung (Alfirevic et al., 2002; Kupferminc, 2003; van Pampus et al., 1999). Das Risiko steigt zudem bei Frauen, die einen limitierten Kontakt zu Spermien des zukünftigen Vaters vor der Empfängnis hatten (Einarsson et al., 2003; Dekker und Robillard, 2003). Ein vorhergehender spontaner oder induzierter Abort und eine gesunde Schwangerschaft reduzieren das Risiko, an einer Präeklampsie zu erkranken, jedoch wird dieser schützende Effekt durch einen Partnerwechsel aufgehoben (Dekker und Robillard, 2003; Saftlas et al., 2003). Änderung im maternalen Immunsystem bedingen zudem die Entstehung einer Präeklampsie, so sind Frauen über 40 Jahren einem erhöhten Risiko ausgesetzt, ebenso Frauen die eine durch IVF (*in vitro* Fertilisation), Gameten- oder Embryonen-Spende induzierte Schwangerschaft durchlaufen, da diese Methoden eine immunologische Reaktion in den Frauen hervorrufen können (Dekker

und Sibai, 2001; Wang et al., 2002). Die Adipositas ist ein nachgewiesener Risikofaktor, der mit Erhöhung des Body-Mass-Index ansteigt (O'Brien et al., 2003).

1.1.5 Das humane plazentare Explant-Modell

Das humane plazentare Explant-Modell wurde erstmals von Genbacev et al. (1992) als Modellobjekt für die Untersuchung des Invasionsvorganges von Trophoblastzellen beschrieben. Während der Implantation und der späteren Plazentaentwicklung invadiert der humane EVT in die Dezidua und in die maternalen Blutgefäße (Fisher, 2004). Damit dieser Mechanismus und die beteiligten Faktoren genauer untersucht werden konnten, wurde ein Modellsystem benötigt, welches am Besten die *in vivo* Situation wiedergeben konnte. Mit Hilfe von humanen plazentaren Explants des ersten und zweiten Trimesters wurde das Invasionsverhalten der EVT-Zellen in verschiedenen, Struktur bildenden Substanzen, welche die EZM imitieren sollten, analysiert (Genbacev et al., 1992). Die Explants bestehen aus einer kleinen plazentaren Zotte mit Trophoblast-Zellsäulen und werden in einem, mit Struktur bildenden Substanzen beschichteten, Kultureinsatz in einer 24-Well-Platte kultiviert (s. Abb. 1.4). Die Invasion von EVT-Zellen konnte nur bei Verwendung von Matrigel oder mit Dezidua Extrakten konditioniertem Kollagen-Gel beobachtet werden. Zusätzlich war ein mit fötalem Kälberserum versetztes Medium für die EVT-Differenzierung und die Viabilität des villösen Trophoblasten essentiell. Die Differenzierung der EVTs konnte nur an plazentaren Explants des ersten Trimesters (5.-10. SSW) beobachtet werden.

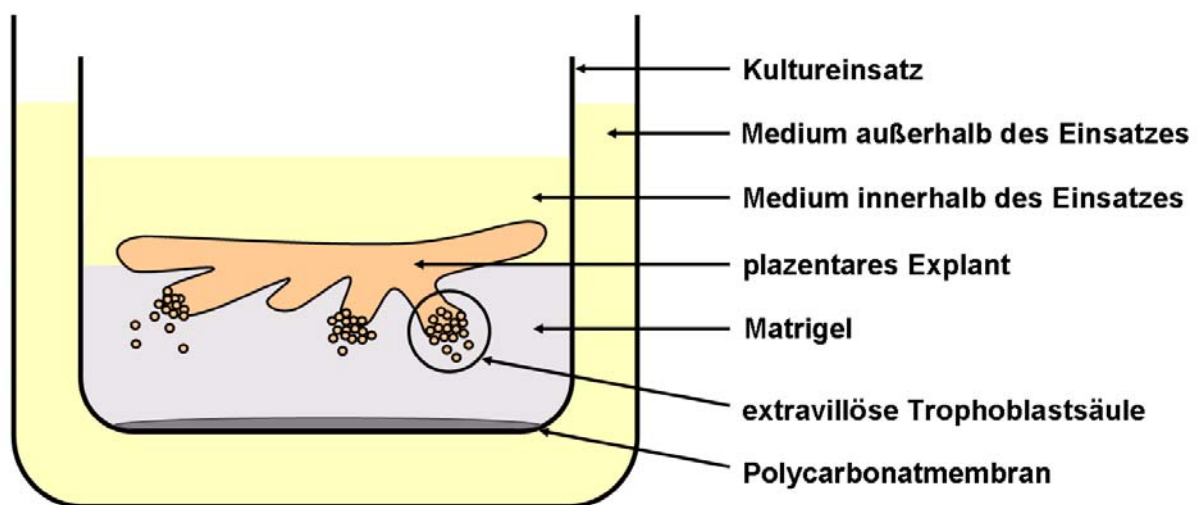


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des plazentaren Explant Modells. Der Kreis in der Abbildung umrandet eine Zellsäule aus EVT-Zellen, welche beginnen in das Matrigel einzuwandern.

Die Viabilität der Explant-Kulturen wurde durch eine konstante Rate an Glukose-Verwertung, Laktat- und Progesteron-Produktion und der fortwährenden hCG-Synthese und -Abgabe bestätigt. Die in das Matrigel eingewanderten Zellen zeigten eine rundliche oder polygonale Form, oftmals vakuoliert mit klar erkennbarem Nukleus, ähnlich den Trophoblastzellen in der Dezidua von frühen hysterektomierten Schwangerschaften. In den Explants konnten proliferative Trophoblastzellen mit einer Ki67-Färbung in den Zellsäulen und der epitheliale Ursprung der Zellen mit einer Zytokeratin-Färbung nachgewiesen werden (Genbacev et al., 1992). Diese Studien bestätigen, dass die plazentaren Explants ein geeignetes Modell darstellen, um die Trophoblastinvasion *in vitro* zu untersuchen.

1.1.6 Die maligne Trophoblast-Zelllinie JEG3

Die Zelllinie JEG3 besteht aus malignen Trophoblastzellen und ist ein Modell für den invasiven EVT der frühen, unreifen Plazenta (Grümmer, 1991). Die JEG3-Zellen wurden erstmals durch Kohler und Bridson (1971) aus einem Chorionkarzinom isoliert. Das Chorionkarzinom ist ein hochinvasiver epithelialer Tumor des Trophoblasten, der zu 50% durch eine molare Schwangerschaft entsteht und von starken, abnormalen Blutungen im Uterus begleitet ist (Ober et al., 1987). Das uterine Chorionkarzinom ist eine hämorrhagische Masse mit einer zottenartigen, unregelmäßigen Oberfläche und besteht hauptsächlich aus mononukleären Trophoblastzellen und Synzytiotrophoblastzellen, die morphologisch den primitiven Trophoblasten darstellen (Shi und Kurman, 2002). Die Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3 zeigt verschiedene normale Trophoblastzell-Charakteristika, wie z.B. die Sekretion von hCG und Progesteron (Benveniste et al., 1978; Benveniste und Scommenga, 1981), die Expression von MMPs und Kollagenase Typ IV (Strickland und Richards, 1992). Bei subkutaner Injektion von JEG3-Zellen in Nacktmäuse konnte beobachtet werden, dass die JEG3-Zellen eine schnell wachsende Tumorbildung induzierten und Zugang zu den Blutgefäßen des Wirts erlangten. Die Zellen ersetzten die Endothelzellen des Wirts und bildeten große, blutgefüllte Lakunen, die auch in der humanen Plazenta zu finden sind. Diese Lakunenbildung konnte nicht in Tumoren ohne Trophoblast-Ursprung gefunden werden. Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit der Umgestaltung der Spiralarterien bei der Entwicklung der hämochorialen Plazenta durch die EVT-Zellen (Grümmer et al., 1999).

1.2 Die CCN-Familie

Die CCN-Familie wurde zwischen Anfang und Ende der 1990er Jahre entdeckt und besteht aus Cystein-reichen, 30-40 kDa großen Proteinen (Brigstock, 1999; Lau und Lam, 1999), welche in Vertebraten vorkommen. Die ersten Mitglieder der Familie wurden als sekretierte Proteine identifiziert, dessen Synthese von mitogenen Wachstumsfaktoren oder Onkogenen induziert wurde. Die Familie umfasst sechs Mitglieder, wobei die drei ersten beschriebenen Mitglieder, CYR61 (*cysteine-rich 61/CCN1*) (O'Brien et al., 1990), CTGF (*connective tissue growth factor/CCN2*) (Bradham et al., 1991) und NOV (*nephroblastoma overexpressed/CCN3*) (Joliot et al., 1992) das Akronym CCN bildeten. Weitere Mitglieder sind WISP1, 2 und 3 (*Wnt-induced secreted protein-1-3/CCN4-6*) (Pennica et al., 1998). Die CCN-Proteine besitzen alle eine multi-modulare Struktur mit einem N-terminalen Sekretionssignal, gefolgt von vier konservierten Domänen mit einer Sequenz-Homologie zu *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs), von *Willebrand factor type C repeat* (vWC), *thrombospondin type I repeat* (TSP-1) und eine Carboxy-terminale (CT) Domäne, welche eine Anhäufung von Cysteinen enthält (Bork, 1993). Jedes Modul wird von einem separaten, konservierten Exon kodiert, welches vermuten lässt, dass die CCN-Gene Produkte des Exon-Shuffling sind (Brigstock, 1999; Lau und Lam, 1999). Abgesehen von CCN5, welches kein CT-Modul enthält, besitzen alle CCN-Proteine den gleichen Aufbau an Modulen und eine eng miteinander verwandte Primärstruktur mit einer Serie von 38 Cystein-Resten, welche stark in ihrer Anordnung und Anzahl konserviert sind und 10% der Gesamtmasse des Proteins ausmachen. Hinter der vWC-Domäne ist eine kurze Sequenz angeordnet, welche in ihrer Länge und Komposition bei den verschiedenen Mitgliedern variiert. Es wird vermutet, dass diese Region als „Gelenk“ zwischen der ersten und zweiten Hälfte des Proteins fungiert, zudem ist es besonders sensitiv gegenüber der Proteolyse durch MMPs (Kireeva et al., 1996; Dean et al., 2007). Die Mitglieder der CCN-Familie können an verschiedene Proteine durch die unterschiedlichen Module binden. Die CCN-Proteine können ihre Aktivitäten durch Interaktionen mit Zelladhäsions-Rezeptoren, zu denen die Integrine und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) gehören, steuern (s. Abb. 1.5). CCN-Proteine können an spezifische Integrine durch zum Teil verschiedene Domänen binden (Ellis et al., 2003; Schober et al., 2003; Leu et al., 2003, 2004; Gao und Brigstock, 2004; Chen N et al., 2004), obwohl sie keine klassische RGD-Bindungssequenz besitzen (Lau und Lam, 1999; Lin et al., 2003). Da CYR61, CTGF und NOV eine Heparin-Affinität besitzen, sind sie in der Lage an die HSPGs als Ko-Rezeptoren auf der Oberfläche von Target-Zellen zu binden (Ball et al., 2003; Chen N et al., 2000; Lin CG et al., 2003; Gao und Brigstock, 2003, 2004). So beeinflusst z.B. die

Bindung an das HSPG Syndecan-4 die Adhäsion und Apoptose in Fibroblasten und die Angiogenese in Endothelzellen (Chen N et al., 2000, 2004; Todorovic et al., 2005; Chen CC et al., 2007). Es konnte zudem eine Hochregulation der CCN-Proteine und damit eine Rolle bei der Inflammation und der Reparatur von Verletzungen nachgewiesen werden (Chen CC et al., 2001a; Latinkic et al., 2001). Außerdem werden sie durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α reguliert (Cooker et al., 2007; Gashaw et al., 2008) und sind bei bakteriellen und viralen Infektionen involviert (Kim et al., 2004; Wiedmaier et al., 2008).

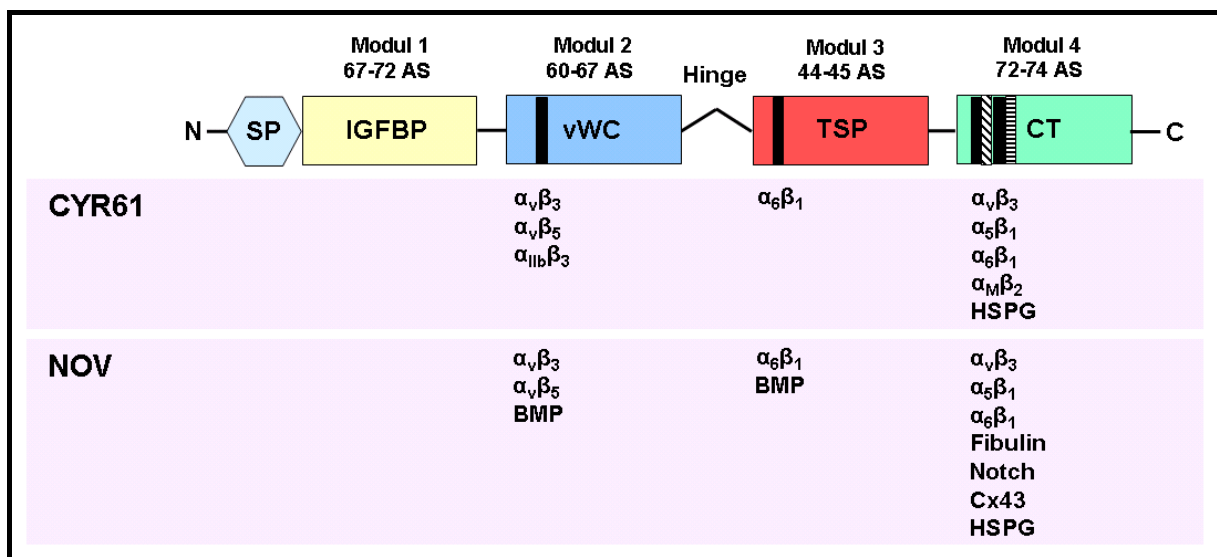


Abb. 1.5: Schema der CCN-Protein-Struktur und der CYR61- und NOV-Bindungspartner. Das Schema zeigt die generelle strukturelle Organisation der CCN-Proteine, wobei WISP-2 kein Modul 4 besitzt. Die CYR61- und NOV-Bindungspartner und deren spezifische Bindungsdomänen sind eingezeichnet. CYR61 bindet ebenfalls an $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_D\beta_2$, jedoch sind die Bindungsdomänen unbekannt (Kireeva et al., 1998; Jedsadayanmata et al., 1999; Chen N et al., 2000; Chen CC et al., 2001b, 2007; Grzeszkiewicz et al., 2001, 2002; Leu et al., 2002; Schober et al., 2002; Ellis et al., 2003; Lin CG et al., 2003, 2005; Todorovic et al., 2005; Yakubenko et al., 2006; Lin MT et al., 2007). (verändert nach: Katsube et al., 2009).

1.2.1 CYR61

CYR61 (CCN1) wurde erstmals während eines differentiellen Hybridisierungs-Screening einer cDNA-Bibliothek von Serum-stimulierten BALB/c 3T3 Fibroblasten, eine murine Fibroblasten-Zelllinie, entdeckt und als 3CH61 bezeichnet (Lau und Nathans, 1985). Die ausführliche Untersuchung erfolgte erst 5 Jahre später durch O'Brien et al. (1990). Die CYR61 cDNA kodiert für ein 379 Aminosäuren langes Protein und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p22-31) lokalisiert (O'Brien et al., 1990; Jay et al., 1997). Die biologischen Fähigkeiten von CYR61 sind abhängig von dessen Interaktionspartnern und können sowohl einen positiven als auch negativen Effekt auslösen. Viele verschiedene

Funktionen werden durch die Bindung an Integrine vermittelt, zu denen CYR61 eine hohe Bindungsaffinität aufweist (Chen Y und Du, 2007). CYR61 ist in der Lage innerhalb der Zelle oder mit umgebenden Zellen in einem autokrin-parakrinen Mechanismus zu interagieren und kann entweder intrazellulär lokalisiert oder mit der EZM und Zelloberflächen assoziiert sein. CYR61 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert (Tamura et al., 2001; Gellhaus et al., 2006), obwohl dessen Primärstruktur keine klassische Nukleus-Lokalisationssequenz besitzt.

Die Stimulation der Zelladhäsion von Fibroblasten ist ein Mechanismus an dem CYR61 beteiligt ist, wobei die durch CYR61 initiierte Signaltransduktion hauptsächlich durch die Bindung an das Integrin $\alpha_6\beta_1$ und Syndecan-4 induziert wird (Chen CC et al., 2007). Diese Bindung induziert die Formation von $\alpha_6\beta_1$ -enthaltenden FA (*focal adhesion*)-Komplexen, welches zu einer Aktivierung der FAK (*focal adhesion kinase*) und RAC-1 (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*) führt, wobei die FAK Paxillin und den ERK (*extracellular signal-related kinase*) -Signalweg aktivieren kann (Chen CC et al., 2001b; Leu et al., 2004). Diese Signalweiterleitung führt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellausbreitung und der Bildung von Filopodien und Lamellipodien (Chen CC et al., 2001b). In einer CYR61-Knockout Studie konnte nachgewiesen werden, dass CYR61 für die Embryo-Entwicklung essentiell ist (Mo et al., 2002). CYR61 Knockout-Mäuse sterben *in utero* aufgrund von Vaskularisierungsdefekten in Plazenta und Embryo. Der Verlust von CYR61 führt zu einem Defekt in der Gefäß-Verzweigung an der chorioallantoiden Schnittstelle, welches zu einer ungenügenden Vaskularisierung in der Plazenta führt, ohne jedoch die Differenzierung des Synzytiotrophoblasten zu beeinträchtigen. Dieser Phänotyp ist mit einer verminderten Expression des pro-angiogenetischen Faktors VEGF-C (*vascular endothelial growth factor -C*) im allantoiden Mesoderm verbunden, wodurch vermutet wird, dass CYR61 die Expression von VEGF-C bei der Gefäßverzweigung reguliert. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager konnte in gesunden Plazenten eine starke Expression von CYR61 in invadierten Trophoblastzellen und in Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems nachweisen. Im Gegensatz dazu war die Präeklampsie mit einer verringerten Expression von CYR61 in der Plazenta und im Serum verbunden (Gellhaus et al., 2006, 2007). Neben der embryonalen Angiogenese spielt CYR61 auch eine Rolle bei der pathologischen Angiogenese wie z.B. in Tumoren oder der Wundheilung (Babic et al., 1998; Xie et al., 2001; Chen CC et al., 2001a; O’Kelly et al., 2008). In verschiedenen Tumoren, zu denen Melanome, Blasenpapillome, Medullablastome, Mamma- und Kolonkarzinome gehören, konnte eine von der Tumorgroße und -stadium abhängige CYR61-Expression nachgewiesen werden. Außerdem konnte CYR61 die Tumorigenität und Vaskularisierung der Tumore signifikant

erhöhen (Babic et al., 1998; Xie et al., 2001; O’Kelly et al., 2008). Im Gegensatz dazu wirkte CYR61 in Lungentumoren als Tumor-Suppressor und wurde durch den β -catenin-c-myc-p53 Signalweg aktiviert (Tong et al., 2001, 2004). Chien et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass CYR61 das Wachstum von humanen endometrialen Tumorzellen supprimiert. Diese Studien zeigen, dass CYR61 gegensätzliche Funktionen abhängig von dem jeweiligen Zelltyp einnehmen kann. In Brustkrebstumoren konnte eine Korrelation zwischen erhöhten CYR61- und Östrogenrezeptor-Expressionsleveln gefunden werden (Xie et al., 2001; Sampath et al., 2001a). Dieses konnte in Brustkrebs-Zelllinien bestätigt werden, in denen eine starke Hochregulation von CYR61 nach Inkubation mit Östrogen nachgewiesen werden konnte (Xie et al., 2001). Zudem konnten die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager und andere zeigen, dass CYR61 stark im Endometrium exprimiert und durch Östrogen reguliert wird (Absenger et al., 2004; MacLaughlan et al., 2007; Gashaw et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager konnte darüber hinaus eine nochmals verstärkte Expression von CYR61 durch Inkubation mit Östrogen und Hypoxie im Endometrium nachweisen (Gashaw et al., 2008). Die Hypoxie induzierte eine transiente Hochregulation der CYR61-mRNA und der CYR61 Proteinsekretion. In Melanomzellen konnte eine durch HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) vermittelte Hochregulation der CYR61-Promotor-Aktivität nachgewiesen werden (Kunz et al., 2003). Außerdem konnten Hirschfeld et al. (2009) in humanen Brustgeweben zeigen, dass die Tumorgenese mit dem Vorhandensein einer alternativ gespleißten Form der CYR61-mRNA, die durch den Verlust des Exon 3 charakterisiert ist, assoziiert ist. Diese Ergebnisse postulieren, dass die Hypoxie ein spezifischer Regulator des alternativen Splicing von CYR61 ist (Hirschfeld et al., 2009). Neben der Hypoxie konnten andere Stressfaktoren, wie z.B. mechanischer Stress und UV-Licht, identifiziert werden, die eine CYR61-Expression induzieren (Chaqour und Goppelt-Strube, 2006; Quan et al., 2006).

CYR61 kann von über 30 Wirkstoffen induziert werden. Es wird durch Wachstumsfaktoren, wie EGF, VEGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und TGF- β stimuliert (Schütze et al., 1998; Abe und Sato, 2001; Sampath et al., 2001b, 2002; Bartholin et al., 2007). Weiterhin wird es durch Chemokine wie IL-1 und IL-6 reguliert (Schütze et al., 1998; Hammacher et al., 2005) und kann durch Serum (O’Brien et al., 1990), Cortisol oder BMP-2 (*bone morphogenic protein -2*) (Parisi et al., 2006) und Progesteron (Gashaw et al., 2008) hochreguliert werden. Die Signalweiterleitung bis zur CYR61-Induktion erfolgt in glatten Muskelzellen und Endothelzellen durch den RhoA (*Ras homolog gene family, member A*)-GTPase- und den p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalweg (Han et al., 2003; Liang et al., 2003). Außerdem kann CYR61 durch den Wnt (*wingless-type murine mammary tumor virus*

integration site family) -Signalweg induziert werden und stimuliert die Wnt-induzierte Osteoblasten-Differenzierung in mesenchymalen Stammzellen (Si et al., 2006).

1.2.2 NOV

Das NOV-Gen wurde erstmals von Joliot et al. (1992) in MAV-1 (*myeloblastosis associated virus-1*) -induzierten Affen-Nephroblastomen identifiziert und als eine Integrationsstelle für das MAV-1 charakterisiert. Das NOV-Gen hat eine Länge von 7,5 kB und ist auf dem Chromosom 8 (8q24) lokalisiert (Martinerie et al., 1992). Die Arbeitsgruppe um Joliot konnte zeigen, dass die Überexpression von NOV mit der Tumorigenese assoziiert ist und dass eine trunkierte Version von NOV die Transformation von embryonalen Fibroblasten im Huhn induzieren kann (Joliot et al., 1992). Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass NOV bei Verlust des N-terminalen Sekretionssignals in der Zelle verbleibt und anti-proliferative Eigenschaften aufweist, welche durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase II Untereinheit rpb7 (Perbal, 1999) oder mit der EGF-ähnlichen Bindungsstelle von Notch1, ein Transmembran-Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung spielt, (Sakamoto et al., 2002) erfolgen. Es ist außerdem bekannt, dass NOV mit dem Kalzium-bindenden Protein S100A4 in Glioblastom- und Neuroblastomzellen interagiert und dadurch den Level an intrazellulärem Kalzium erhöht (Li et al., 2002), welches auf eine Rolle bei der Kalzium-Fluss assoziierten Zellwachstums-Kontrolle, der Motilität und der Ausbreitung von Zellen hinweist (Li et al., 2002). Die C-terminale Domäne von NOV interagiert mit Fibulin-1C (Perbal, 1999), ein Glykoprotein der EZM, welches an der Zelladhäsion beteiligt ist (Argraves et al., 1989).

NOV wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, zu denen Knochen, Knorpel, das zentrale Nervensystem, die Leber und Muskelgewebe gehören (Chevalier et al., 1998; Su et al., 1998; Perbal, 2001; Kocialkowski et al., 2001; Katsube et al., 2001). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass NOV in der humanen Embryogenese in allen drei Keimblättern exprimiert wird (Kocialkowski et al., 2001). Eine Studie von Gupta et al. (2007) konnte die Expression von NOV in CD34⁺ (*cluster of differentiation 34*⁺) pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut nachweisen. Knock-down- und Überexpressions-Experimente konnten zudem eine kritische Rolle für NOV in der Selbsterneuerung der Zellen und der Differenzierung hin zu Vorläuferzellen aufzeigen (Gupta et al., 2007). NOV ist außerdem in der Lage in mesenchymalen Stammzellen die Differenzierung zu Chondrozyten zu stimulieren (Djouad et al., 2007) und zu Osteoblasten zu

inhibieren (Minamizato et al., 2007). Die Bindung von NOV an BMP-2, welches die Phosphorylierung der Smad (*mothers against decapentaplegic homolog*)-Proteine verhindert und gleichzeitig den Notch-Signalweg aktiviert, führt zur Inhibition der Osteoblast-Differenzierung (Minamizato et al., 2007; Shindo et al., 2003). In Endothelzellen gilt NOV als positiver Wachstumsregulator und vermittelt Zell-Adhäsion, Migration und spielt eine Rolle bei der Homöostase der Zelle (Lin et al., 2003). Die durch NOV vermittelte Adhäsion in Endothelzellen ist mit den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ assoziiert, welche notwendig für die NOV-induzierte Migration und Chemotaxis sind (Lin et al., 2003). Weiterhin kann NOV die Neovaskularisierung in der Kornea in Ratten induzieren (Lin et al., 2003). NOV ist außerdem in den Wundheilungsprozess involviert, vermittelt die Fibroblast-Adhäsion und -Chemotaxis und reguliert Faktoren, die mit dem Wundheilungsprozess assoziiert sind, wie MMP-1, PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) und TGF- β 1 (Lin et al., 2005). Die Expression von NOV kann in verschiedenen Arten von Tumorzellen gefunden werden, zu denen, neben den Neuroblastomen und Wilms-Tumoren, Osteosarkome und Chondroblastome gehören (Chevalier et al., 1998; Manara et al., 2002; Ayer-Lelievre et al., 2001). Eine Knock-out-Maus von NOV ist bisher nicht beschrieben, jedoch zeigt die gerichtete Mutation von NOV (Novdel3^{-/-}), d.h. eine Deletion des Exon 3 (vWC Domäne), viele verschiedene Fehlbildungen im Embryonalstadium auf, zu denen Defekte im axialen und appendikularen Skelettwachstum, Gelenk-Fehlbildungen und verspätete Verknöcherung gehören. Darüber hinaus war die kardiale und Muskel-Entwicklung beeinträchtigt (Heath et al., 2008). In humanen adrenokortikalen Zellen konnte eine Inhibition der NOV-mRNA durch TGF- β 1 gezeigt werden. Die Signalweiterleitung erfolgte jedoch durch den Transkriptionsfaktor c-Jun und MEKK1 (*mitogen-activated/extracellular response kinase kinase 1*) und nicht durch die Smad-Proteine, welche üblicherweise durch TGF- β -Signale aktiviert werden (Lafont et al., 2002). Eine weitere Studie in Chondrozyten bestätigte die inhibitorische Wirkung von TGF- β 1 auf NOV (Lafont et al., 2005). In Gliomazellen konnte eine Inhibition des Zellwachstums und der Tumorigenität durch NOV nachgewiesen werden (Gupta et al., 2001), wogegen NOV mit einer erhöhten Zellproliferation im Nieren- und Prostatakarzinom assoziiert ist (Glukhova et al., 2001; Maillard et al., 2001). In gesunden Plazenten konnte, wie bei dem CYR61-Protein, eine starke Expression von NOV in invasiven Trophoblastzellen und Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems nachgewiesen werden. Zudem war die Präeklampsie ebenfalls mit einer verringerten Expression von NOV in der Plazenta und im Serum verbunden (Gellhaus et al., 2006, 2007). Genearrays der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3 zeigten eine Hochregulation von NOV durch die Induktion des Gap Junction Proteins Connexin43 (Cx43) (Gellhaus et al., 2004). Die Connexin-Proteine formen

Zellkommunikationskanäle, sog. Gap Junctions (Willecke et al., 2002; Söhl und Willecke, 2004). Weitere Untersuchungen ergaben, dass NOV bei der Wachstumsregulation der JEG3-Zellen involviert ist. Eine Hochregulation von NOV führte zu einer drastischen Reduktion der Proliferationseigenschaften der JEG3-Zellen (Gellhaus et al., 2004).

1.3 Hypoxie und HIF-1 α

Die Hypoxie, eine Reduktion des physiologischen Sauerstoffgehalts, tritt während akuten und chronischen vaskulären Erkrankungen, Lungen- und Tumorerkrankungen auf. Zudem tritt ein hypoxisches Milieu zu Beginn der Schwangerschaft in der Plazenta auf und ist mit der Präeklampsie assoziiert. Obwohl Hypoxie sowohl für normale Zellen, als auch für Tumorzellen toxisch ist, können Tumorzellen genetische und adaptive Veränderungen durchlaufen, die ein Überleben und sogar die Proliferation in hypoxischen Umgebungen ermöglichen (Harris, 2002). Die akute Hypoxie tritt bei der sog. Reoxygenierungs-Verletzung auf, wenn sich Blutgefäße verschließen und wieder öffnen. Dadurch wird bereits hypoxisches Gewebe mit oxygeniertem Blut durchströmt, welches die Konzentration von freien Sauerstoffradikalen ansteigen lässt und zu Gewebeerstörung und der Aktivierung von Stress-induzierten Genen führt (Prabhaka, 2001). Ein Mechanismus, mit dem Zellen auf Hypoxie reagieren, ist die Induktion von HIF-1 α . HIF-1 ist ein Heterodimer aus dem Hypoxie-induzierbaren HIF-1 α und dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β /ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) (Huang et al., 1996). HIF-1 α und HIF-1 β sind beides Mitglieder der bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*)-Superfamilie. Diese Proteine haben eine Interaktionsdomäne (PAS), welche als Umgebungssensor, Liganden-bindende und Signalweiterleitungs-Domäne agieren kann.

Die HIF-1 α - und HIF-1 β -mRNA wird in fast allen humanen Geweben exprimiert und es wird vermutet, dass HIF-1 α eine Hauptrolle in der hypoxischen Signalgebung einnimmt (Semenza, 2000). In der Abwesenheit von Sauerstoff wird HIF-1 α in den Nukleus rekrutiert, dimerisiert dort mit HIF-1 β , bindet als HIF-1-Komplex an die HRE (*hypoxia responsive element*)-Bindestellen von verschiedenen Genen und induziert deren Transkription (Zagórska und Dulak, 2004). Bei normalem Sauerstoffgehalt (Normoxie) katalysieren Prolylhydroxylasen (PHDs), hauptsächlich PHD-2, die Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Hydroxylierung von spezifischen Prolylresten (Pro402 und Pro564) in der Sauerstoff-abhängigen Degradationsdomäne (ODD, *oxygen-dependent degradation domain*) von HIF-1 α (Huang et al., 1998; Bruegge et al., 2007). Die Hydroxylierung wirkt als Erkennungssignal für die Bindung des

von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Proteins (pVHL), welches Teil des E3-Ubiquitinligase-Komplexes ist, an HIF-1 α (Maxwell et al., 1999; Cockman et al., 2000; Tanimoto et al., 2000) und fördert die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von HIF-1 α (Salceda und Caro, 1997; Maxwell et al., 1999; Kenneth und Rocha, 2008) (s. Abb. 1.6).

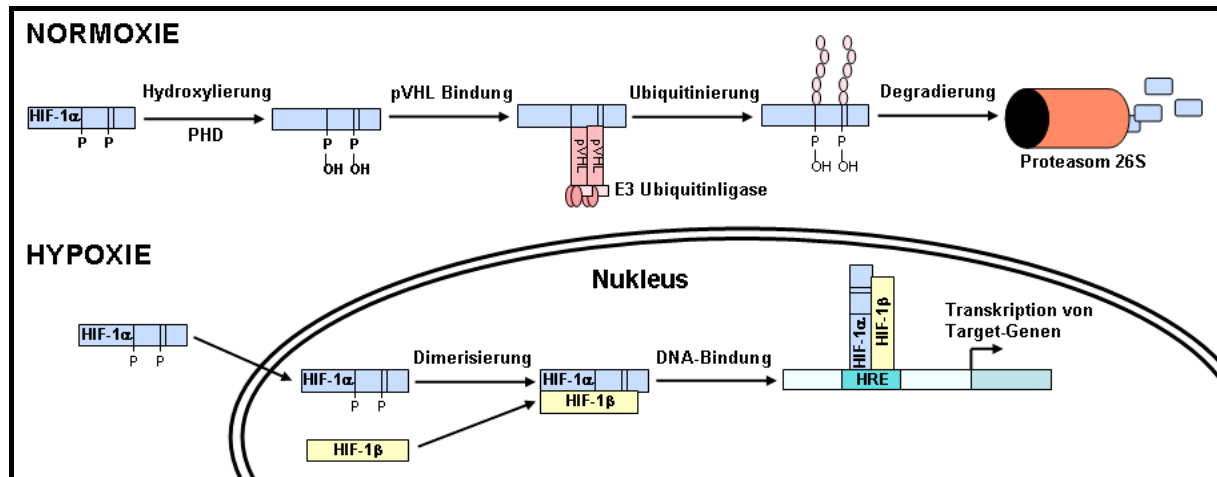


Abb. 1.6: Regulation der HIF-1 α -Protein-Stabilität. (verändert nach Zagórska und Dulak, 2004).

1.3.1 Hypoxie-regulierte Signalwege

Durch Hypoxie- und HIF-1 α -induzierte Gene regulieren viele verschiedene Prozesse zu denen Zellproliferation, Angiogenese, Metabolismus, Apoptose, Migration und Invasion gehören (Harris, 2002; Semenza, 2003). Zu diesen Regulatoren gehören Angiogenesefaktoren, Proliferations- und Zell-Adhäsions-Gene. Zu den am Besten untersuchten HIF-1 α -aktivierten Wachstumsfaktoren gehört VEGF und dessen Rezeptor sFlt1 (*soluble FMS-related tyrosine kinase 1*). Der Angiogenesefaktor VEGF nimmt eine Schlüsselrolle bei der Gestaltung neuer Blutgefäße und der Regulierung der Endothelzell-Proliferation ein (Harris, 2002) und wird sowohl von Tumorzellen, als auch von normalen Zellen durch Hypoxie-Einwirkung sekretiert. HIF-1 α reguliert die Expression von Angiopoietin-2 hoch, welches an Stellen der vaskulären Umgestaltung exprimiert wird und eine Rolle bei der Destabilisierung von Gefäßen in normaler oder pathologischer Angiogenese spielt (Simon et al., 2008). Außerdem induziert HIF-1 α die Produktion von TGF- β und PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Denko et al., 2000; Koong et al., 2000; Wykoff et al., 2000; Lal et al., 2001) und reduziert die Expression von anti-angiogenetischen Proteinen wie Thrombospondin-1 und -2 (Kung et al., 2000; de Fraipont et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α essentiell für die

normale Embryogenese ist, da HIF-1 α -defiziente Mäuse *in utero* auf Grund von Vaskularisierungsdefekten sterben (Ryan et al., 1998).

1.3.2 Hypoxie-regulierte Faktoren in der humanen Plazenta

Die frühe Embryonalentwicklung findet in einer physiologisch hypoxischen Umgebung statt, welche eine Schlüsselfunktion in der Trophoblast-Differenzierung einnimmt (Genbacev et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Sauerstoffkonzentrationen (2% O₂) die Trophoblastzellen in einem proliferativen, nicht-invasiven Stadium halten und den für die frühe Plazenta-Entwicklung typischen Phänotyp aufrecht erhalten. Die Rolle, welche die Hypoxie in der Trophoblastinvasion einnimmt wird kontrovers diskutiert, zum Einen kann sie negativ (1) und zum Anderen positiv (2) auf die Trophoblastinvasion einwirken. (1) Durch den gezielten Nachweis von Proteinen, die an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Mitose von Trophoblastzellen auf Kosten des Differenzierungsprozesses stimuliert (Genbacev et al., 1997). Eine andere Arbeitsgruppe konnte diese Ergebnisse bestätigen. Sie zeigten, dass Hypoxie die Anzahl an villösen Zytotrophoblastzellen durch einen Mechanismus, der die Mitoserate erhöht und den Zellzyklus verkürzt, erhöht (Arnholdt et al., 1991). Zudem stimuliert Hypoxie die Expression von Proteinen, die einen intermediären Trophoblast-Phänotyp bedingen, wie die Proliferations-fördernde FAK, α 5-Integrine, MMP2 und die Synthese von Fibronektin (Caniggia et al., 2000a; Mac Phee et al., 2001). (2) Die Kultivierung von Trophoblastzellen (HTR-8/SVneo) unter Hypoxie (1% O₂) zeigte eine erhöhte Invasion der Zellen in Matrigel auf und erhöhte die Expression von uPA (*urokinase-type plasminogen activator*)-Rezeptoren, welche an der Degradierung der EZM beteiligt sind (Graham et al., 1998). Zudem konnte eine erhöhte Expression von PAI-1 nachgewiesen werden, welches freies uPA bindet (Fitzpatrick and Graham, 1998). Auf Grund dieser Ergebnisse vermuteten Graham und Kollegen ein Modell, in welchem Hypoxie zum Einen die Trophoblastinvasion durch Hochregulation der uPA-Rezeptor-Expression an der Invasionsfront erhöht und zum Anderen die Sekretion von PAI-1 an der Stelle an der keine proteolytische Aktivität mehr benötigt wird, jedoch die Absonderung einzelner Zellen für die Migration notwendig ist, stimuliert (Graham et al., 2000). *In vitro*-Studien mit BeWo-Chorionkarzinom-Zellen konnten eine Induktion des Leptin-Promotors durch HIF-1 α zeigen (Grosfeld et al., 2002). Es ist bekannt, dass Leptin stark an der Invasionsfront der Trophoblast-Zellsäulen exprimiert wird und die Bindung an dessen Rezeptor die Invasion der EVT-Zellen stimuliert (Castellucci et al., 2000). Zudem

konnten McCaig und Lyall (2009) zeigen, dass die Inkubation von humanen plazentaren Explants unter 1% O₂ die Expression von GCM1 (*glial cells missing 1*), welches in Mäusen die Invasion von Trophoblastzellen stimuliert, im Vergleich zu der physiologischen Sauerstoffkonzentration von reifen Plazenten (8% O₂) oder 20% O₂ steigert.

Die Interpretation des Auswachsens von plazentaren Explants ist oft widersprüchlich. In manchen Arbeitsgruppen wird das Auswachsen als ein Nachweis der Trophoblast-Proliferation angesehen und es wird klar von der EVT-Migration getrennt (Caniggia et al., 2000a). In anderen Arbeitsgruppen wird das Auswachsen als Invasion der EVT-Zellen angesehen (Irving et al., 1995b; James et al., 2004).

1.3.3 Hypoxie und Präeklampsie

Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen konnten eine erhöhte Expression von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in präeklampsischen Plazenten zeigen (Rajakumar et al., 2001; Caniggia und Winter, 2002). Genexpressions-Profile von präeklampsischen Plazenten scheinen außerdem mit den Expressions-Profilen von unter Hypoxie kultivierten plazentaren villösen Explant-Modellen und Plazenten von Patientinnen mit Bluthochdruck zu korrelieren (Soleymanlou et al., 2005). Zudem scheinen die hypoxischen Effekte Zelltyp-spezifisch zu sein, da eine erhöhte Expression des VEGF-Rezeptors sFlt1 unter Hypoxie nur in Zytotrophoblastzellen, nicht aber in Endothelzellen, nachgewiesen werden konnte. Die Hochregulation führt zu einer Inhibition von VEGF, da sFlt1 VEGF bindet, und in Folge dessen zu einem anti-angiogenetischen Einfluss (Nagamatsu et al., 2004). Die anormale Plazentation und die begleitende Hypoxie scheinen ein Ungleichgewicht in der Produktion von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren an der maternal-fötalen Schnittstelle und deren Abgabe in den maternalen Blutkreislauf zu induzieren. Dieses ruft die endothelialen Dysfunktionen hervor und führt u.a. zu den klinischen Symptomen der Präeklampsie (Lam et al., 2005; Wang et al., 2009; Steinberg et al., 2009). Inzwischen sind viele verschiedene angiogenetische Faktoren bzgl. ihrer Beteiligung an der Präeklampsie untersucht worden, zu denen u.a. die herunterregulierten pro-angiogenetischen Faktoren PLGF (*placental growth factor*) (Zhou et al., 2002; Schmidt et al., 2007a), wodurch endotheliale Defekte in der Plazenta hervorgerufen werden, CYR61 und NOV (Gellhaus et al., 2006, 2007) gehören. Im Gegensatz dazu sind anti-angiogenetische Moleküle wie das lösliche Endoglin (sEng, *soluble endoglin*), ein Zelloberflächen-Ko-Rezeptor für TGF-β1, und der bereits erwähnte Rezeptor s-Flt1 hochreguliert (Maynard et al., 2003; Venkatesha et al., 2006). Die erhöhte Expression

von sEng in präeklampsischen Seren korreliert mit einer schwerwiegenden Präeklampsie und fällt nach der Geburt ab. Das sEng inhibiert die Röhrenbildung von Kapillaren *in vitro* und induziert vaskuläre Permeabilität und Bluthochdruck *in vivo* (Venkatesha et al., 2006). Da bekannt ist, dass erhöhte maternale Expressionslevel von sFlt1, sEng und PLGF Wochen vor dem Ausbruch der Präeklampsie detektierbar sind (Levine et al., 2006; Stepan und Jank, 2009), wurden Studien zum gezielten Nachweis dieser Risikofaktoren durchgeführt. Durch den gemeinsamen Nachweis von sFlt1 und PLGF konnte eine frühe Präeklampsie mit einer Sensitivität von 83% und Spezifität von 95% vorausgesagt werden. Die kombinierte Analyse von sEng und sFlt1 wies eine frühe Präeklampsie mit einer Sensitivität von 100% und Spezifität von 93% nach (Stepan und Jank, 2009).

1.4 TGF- β 3

Bisher wurden fünf Mitglieder der TGF- β -Familie von Wachstumsfaktoren identifiziert. TGF- β 1, - β 2 und β 3 sind in mesenchymalen Geweben, Endothel- und Immunzellen, Chondro- und Thrombozyten von Säugetieren exprimiert (Ohta et al., 1987; Derynck et al., 1988; Madisen et al., 1988; Roberts und Sporn, 1990), wogegen TGF- β 4 und - β 5 wahrscheinlich das Homolog zu TGF- β 1 im Huhn und im *Xenopus* darstellen (Burt und Paton, 1992; Burt und Law, 1994). Die TGF- β -Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und der Gewebe-Homöostase (Massague et al. 2000; Wu und Hill 2009). Die Funktionen von TGF- β -Proteinen umfassen die Produktion von EZM-Komponenten, die Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, Chemotaxis, Immunsuppression und Regulation der Apoptose (Böttner et al., 2000). Die Funktionen der Isoformen hängen von den Zelltypen, dem Differenzierungsgrad und dem Vorhandensein von anderen Zytokinen ab (Nathan und Sporn, 1991; Krieglstein et al., 1995). Die Signalweiterleitung der TGF- β -Proteine erfolgt durch die heterodimere Komplexbildung von T β R-II (*ligand-binding type II receptor*) und T β R-I (*signal transducing type I receptor*) mit einer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität (Piek et al. 1999; Massague und Gomis 2006). Der Rezeptor-Komplex phosphoryliert Smad2 und Smad3, welche wiederum heterodimere Komplexe mit Smad4 formen. Der Smad-Komplex migriert in den Nukleus und aktiviert die Expression von Target-Genen (Nakamura et al., 2009). Die gerichtete Deletion des TGF- β 3-Gens resultiert in defekter Palatogenese (Gaumenbildung) und verspäteter Lungenentwicklung. Die TGF- β 3^{-/-}-Neugeborenen haben eine Gaumenspalte, die sie nicht befähigt zu saugen und zu atmen, in Folge dessen sie kurz nach der Geburt sterben (Proetzel et al., 1995; Kaartinen et al., 1995). Zu den

Bindungspartnern von TGF- β 3 gehören u.a. Eng und VEGF, welche beide in der Präeklampsie dysreguliert sind. Die Zugabe von TGF- β 3 zu villösen plazentaren Explants unter Hypoxie erhöht die Eng-Expression, welches durch die inhibierende Wirkung durch TGF- β 3-neutralisierende Antikörper bestätigt wurde (Yinon et al., 2008). Caniggia et al. konnten zeigen, dass TGF- β 3 eine wichtige Rolle bei der Trophoblast-Differenzierung spielt und in präeklampsischen Plazenten überexprimiert wird (Caniggia et al., 1999). Durch antisense-Inhibition von HIF-1 α konnte die TGF- β 3-mRNA in villösen plazentaren Explants herunterreguliert werden (Caniggia et al., 2000a). Zudem konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α die Promotor-Aktivität von TGF- β 3 reguliert (Nishi et al., 2004).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der CCN-Proteine CYR61 und NOV im humanen Trophoblasten unter Hypoxie bezüglich dessen Beteiligung an der Trophoblastinvasion und der Präeklampsie untersucht werden. Die Invasion des Trophoblasten in das maternale Kompartiment beginnt in dem ersten Trimester der Schwangerschaft und findet in einem hypoxischen Milieu von ca. 1-3% O₂ innerhalb der sich bildenden Plazenta statt (Rodesch et al., 1992; Jauniaux et al., 2000), welches eine Voraussetzung für die Invasion des Trophoblasten ist (Genbacev et al., 1996, 1997; Jauniaux et al., 2006). Diese Invasion ist in der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie gestört, welches zu einer plazentaren Insuffizienz führt. Die mögliche Beteiligung der CCN-Proteine an der Trophoblastinvasion konnte durch verschiedene Studien angedeutet werden. Es ist bekannt, dass CYR61 und NOV an Migrationsprozessen beteiligt sind (Grzeszkiewicz et al., 2001; Mo et al., 2002; Lin et al., 2003). CYR61 stimuliert z.B. die Migration von humanen Fibroblasten und ist maßgeblich an der plazentaren und embryonalen Gefäßbildung beteiligt, welches durch CYR61-Knockout Studien nachgewiesen werden konnte (Grzeszkiewicz et al., 2001; Mo et al., 2002). NOV kann in humanen Endothelzellen die Adhäsion, Migration und Chemotaxis induzieren (Lin et al., 2003). Darüber hinaus konnten Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager zeigen, dass die Hochregulation von NOV zu einer starken Reduktion der Proliferationseigenschaften der JEG3-Zellen führte (Gellhaus et al., 2004). Da das Umgehen des Zellzyklus einer der wichtigsten Schritte bei der Differenzierung der EVT-Zellen zu einem invasiven Phänotyp ist (Genbacev et al., 1992), wurde vermutet, dass NOV einer der Regulatoren der EVT-Differenzierung entlang des invasiven Signalweges sein könnte. Da weiterhin bekannt ist, dass CYR61 durch Hypoxie in Melanomzellen und

endometrialen Zellen reguliert werden kann (Kunz et al., 2003; Gashaw et al., 2008), wurde die Expression der beiden CCN-Proteine zunächst in der humanen Plazenta untersucht. Die Untersuchungen zeigten in normalen Plazenten eine starke Expression von CYR61 und NOV in EVT-Riesenzellen. Zudem konnte eine Expression der beiden Moleküle in Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems nachgewiesen werden (Gellhaus et al. 2006). Dagegen zeigten Plazenten und Seren von Patientinnen mit einer schweren frühzeitig beginnenden Präeklampsie eine verringerte Expression von CYR61 und NOV im Vergleich zu Plazenten und Seren des gleichen Gestationsalters gesunder Patientinnen (Gellhaus et al., 2006, 2007). Diese Ergebnisse lieferten zusätzliche Hinweise zu der Beteiligung von CYR61 und NOV an der Trophoblastinvasion, da die veränderte Expression in der Präeklampsie mit der unzureichenden Trophoblastinvasion korreliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation von CYR61 und NOV unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen in dem frühen invasiven Trophoblasten zu untersuchen und mögliche Regulatoren des Signalweges aufzuzeigen. Als Modell für den frühen invasiven Trophoblasten wurden zum Einen humane plazentare Explants des ersten Trimesters der Schwangerschaft verwendet und zum Anderen die maligne Trophoblast-Zelllinie JEG3. Zunächst sollte mit Hilfe der plazentaren Explants und der JEG3-Zellen die Lokalisation und Regulation von CYR61 und NOV unter niedrigen hypoxischen Sauerstoffbedingungen untersucht werden. Verschiedene Experimente mit der JEG3-Zelllinie sollten anschließend Aufschluss über mögliche Regulatoren des Hypoxie-vermittelten Signalweges geben, wobei HIF-1 α und TGF- β 3 als mögliche Regulatoren diskutiert wurden. Auf Grund dessen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- (1) Erfolgt eine unterschiedliche Regulation der CYR61- und NOV-Expression bei Kultivierung der plazentaren Explants unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (3% O₂ im Vergleich zu 8% O₂ bzw. 20% O₂) ?
- (2) Welchen Einfluss hat die Sauerstoffkonzentration auf das Invasionsverhalten der Trophoblastzellen der plazentaren Explants?
- (3) Erfolgt eine unterschiedliche Regulation der CYR61- und NOV-Expression in den JEG3-Zellen bei der Kultivierung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (1% O₂ im Vergleich zu 20% O₂)?
- (4) Verändert die Hypoxie die Lokalisation von CYR61 und NOV in den JEG3-Zellen?
- (5) Wird die Hypoxie-abhängige Regulation von CYR61 und NOV durch HIF-1 α oder TGF- β 3 gesteuert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plastikgefäße und Einwegartikel

Die verwendeten Plastikgefäße und Einwegartikel wurden von den Firmen Becton Dickinson (Bedford, MA, USA), Greiner Bio-One (Frickenhäusen), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), TPP (Trasadingen, Schweiz) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Agarose, UltraPure	Invitrogen (Karlsruhe)
APS	Merck (Darmstadt)
BLOCK-iT Fluorescent Oligo	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Carl Roth (Karlsruhe)
DAB Liquid Substrate-Chromogen-System	Dako (Hamburg)
DABCO	Carl Roth (Karlsruhe)
DAKO blocking solution	Dako (Hamburg)
DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DEPC	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glucose Monohydrat	Serva (Heidelberg)
Dinatriumsalz	Merck (Darmstadt)
DMEM / F12 Phenolrot-frei	Invitrogen (Karlsruhe)
DMOG	Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz)
DMSO	Merck (Darmstadt)
DNA-Leiter Gene Ruler 100 bp plus (0,1 µg/µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Polymerase Biotherm (5 U/µl) + 10x Puffer	GeneCraft (Köln)
DNase I (1 U/µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
10 x DNase I-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	GeneCraft (Köln)
DTT (0,1 M)	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA >99%	Serva (Heidelberg)
Eosin	Carl Roth (Karlsruhe)
Eppi-Pistill	Eppendorf (Hamburg)
Ethidiumbromidlösung 1%; 10mg/ml	Serva (Heidelberg)
Ethanol absolut	Riedel-de Haën (Seelze)
Essigsäure 100%	Carl Roth (Karlsruhe)
E.Z.N.A. Total RNA Kit	Omega Bio-tek (Norcross, GA, USA)
FBS	Biochrom (Berlin)

Formaldehydlösung 37%	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Riedel-de Haën (Seelze)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
HPLC-H ₂ O	Merck (Darmstadt)
Hybond-C Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Isotone NaCl-Lösung (0,9%)	Braun (Melsungen)
INTERFERin Transfektionsreagenz	Polyplus-transfection (New York, NY, USA)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
Ladepuffer 6 x Orange Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Luminol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Matrigel Phenolrot-frei	Becton Dickinson (Bedford, MA, USA)
MEM-EARLES w/o L-Glutamine	Invitrogen (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol pro analysis	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Milchpulver fettfrei	TSI (Zeven)
Millicell-CM Kultureinsatz 0,4 µm; 12 mm	Millipore (Billerica, MA, USA)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
MMLV RT (200 U/µl) + 5 x Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Mowiol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumfluorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Nitrozellulosemembran Hybond™-C Extra	GE Healthcare (München)
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Normocin	Lonza (Basel, Schweiz)
OCT	Dako (Hamburg)
Oligo(dT) ₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraplast Tissue Embedding Medium	McCormick Scientific (St. Louis, MO, USA)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS	Biochrom (Berlin)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
2-Propanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Proteasehemmer Inhibitor Complete EDTA-free	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein-Standard PAGE Ruler	Fermentas (St. Leon-Roth)
rekombinantes humanes TGF-β3 (aus E.coli)	PeproTech (Hamburg)
Rotiquant protein assay	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese NF-Acrylamid / Bis-Lösung 40%	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37%	Carl Roth (Karlsruhe)
siCONTROL Non-Targeting siRNA #2	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
siGENOME duplex, humanes HIF-1α	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)

5 x siRNA Puffer	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
SDS ultra pure >99%	Carl Roth (Karlsruhe)
Shandon Histomount	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
Streptavidin-HRP	Dako (Hamburg)
Sucrose	Merck (Darmstadt)
Sudan Black	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (2,5 g / l - 0,38 g / l)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)
Whatman-Papier, 3mm	Biometra (Göttingen)
X-Ray Filme Super RX	Fuji Medical (Düsseldorf)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen, -platten	Falcon (Heidelberg)

2.1.3 Antikörper

Tab. 2.1: Primäre Antikörper.

Antikörper	Klonalität	Konzentration	Applikation	Hersteller
Kaninchen anti-humanes β -Aktin	polyklonal	1:600	WB	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kaninchen anti BSA	polyklonal	1:5000	WB	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kaninchen anti humanes CYR61	polyklonal	1:1000	WB	Schütze <i>et al.</i> , 2007
Kaninchen anti humanes CYR61 N-terminal	polyklonal	1:50	IHC	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
Kaninchen anti humanes CYR61 gesamt	polyklonal	1:50	IZC	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
Maus anti humanes HIF-1 α	monoklonal	1:100	WB	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Maus anti humanes HLA-G	monoklonal	1:75	IHC	Abcam (Cambridge, UK)
Kaninchen anti humanes NOV	polyklonal	1:1000; 1:50	WB; IHC	Dr. N. Schütze (Würzburg), Dr. A. Gellhaus (Essen)
Ziege anti humanes NOV	polyklonal	1:50	IZC	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Kaninchen anti humanes TGF- β 3	polyklonal	1:100	WB	Abcam (Cambridge, UK)
Maus anti humanes Zytokeratin 7	monoklonal	1:100	IHC	Dako (Hamburg)

(WB = Western Blot, IHC = Immunhistochemie, IZC = Immunzytochemie)

Tab. 2.2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Klonalität	Konzentration	Applikation	Hersteller
Ziege anti Kaninchen HRP	polyklonal	1:10000	WB	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg)
Ziege anti Maus HRP	polyklonal	1:10000	WB	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg)
Ziege anti Maus biotinyliert	polyklonal	1:300	IHC	Dako (Hamburg)
Ziege anti Maus Cy3-konjugiert	polyklonal	1:200	IHC	Dianova (München)
Ziege anti Kaninchen Cy3-konjugiert	polyklonal	1:100	IZC	Dianova (München)
Esel anti Ziege Alexa Fluor® 488	polyklonal	1:300	IHC	MoBiTech (Goettingen)
Esel anti Kaninchen Alexa Fluor® 488	polyklonal	1:200	IZC	MoBiTech (Goettingen)

2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Tab. 2.3: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Strang	Sequenz (5' - 3')	Genbank-Nr.	Position	Produktgröße (Bp)
β-Aktin-F	sense	ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G	NM_001101	302-326	214
β-Aktin-R	antisense	CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G		491-515	
β-Aktin-1	sense	ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G	NM_001101	449-473	698
β-Aktin-2	antisense	CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G		1122-1146	
CYR61 varF	sense	AAG GAG CTG GGA TTC GAT G	NM_001554	765-783	142
CYR61 var R	antisense	TCT GGC CTT GTA AAG GGT TG		887-906	
HIF-1α	sense	GCT GGC CCC AGC CGC TGG AG	NM_001530	1601-1620	214
HIF-1α	antisense	GAG TGC AGG GTC AGC ACT AC		1795-1814	
NOV-F	sense	CAC GGC GGT AGA GGG AGA TA	NM_002514	527-546	251
NOV-R	antisense	GGG TAA GGC CTC CCA GTG AA		758-777	
PHD2	sense	CGA CCT GAT ACG CCA CTG TA	AJ310543.1	927-946	90
PHD2	antisense	CCA TTG CCC GGA TAA CAA		999-1016	
TGF-β3	sense	GGA ATG AGC AGA GGA TCG AG	NM_003239	1344-1363	218
TGF-β3	antisense	ATT GGG CTG AAA GGT GTG AC		1542-1561	

(Bp = Basenpaare)

2.1.5 Plazentagewebe

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plazentaprobe wurden zum Zeitpunkt des Schwangerschaftsabbruchs mittels Küretage entnommen. Die Gewebeprobe stammen aus der Praxis für Frauenheilkunde und Geburtshilfe von Dr. Thomas Ring in Essen und wurden zum Zeitpunkt des Schwangerschaftsabbruchs zwischen der 6. und 9. SSW entnommen. Von jeder Patientin wurde bei Zustimmung zur wissenschaftlichen Studie vor der Operation und Gewebeentnahme eine schriftliche Einverständniserklärung entgegen genommen. Jede Patientin erhielt vor dem Eingriff und der Gewebeentnahme Informationsmaterial über die wissenschaftliche Studie, welches die Richtlinien und die Zustimmung der deutschen wissenschaftlichen Ethikkommission enthielt, und wurde zusätzlich mündlich aufgeklärt.

2.1.6 Zelllinie

In dieser Arbeit wurde die humane Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3 (ATCC HTB-36) verwendet, welche von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

erworben wurde. Die Zelllinie ist eine von sechs klonal entstandenen Linien, welche aus dem Erwin-Turner Tumor von Kohler und Bridson (1971) isoliert wurden.

2.1.7 Geräte

Brutschrank US Autoflow
Brutschrank Hera Cell 150 (O₂ regulierbar)

Geldokumentationssystem Herolab SU-1
Gelelektrophoresekammer

Konfokales Laser-Scan Mikroskop (LSM 510)
Kryostat CM 1850 UV
Lichtmikroskop Labovort FS
Lichtmikroskop Axiovert 25
Mikrotom 2050 Supercut
PCR-Maschine T3 Thermocycler
pH-Meter HI 9025
Photometer BioPhotometer plus
Spannungsquelle PHERO-stab. 500
Real-time PCR-Maschine ABI Prism 7300
SDS PAGE Elektrophoresekammer
Sterilbank Class II
Western Blot Elektrophoresekammer
Ultraschallgerät 50-Watt Model
Zellzählgerät CasyCounter CASY[®]1
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424
Zentrifuge: Hettich Rotina 38R

NuAire (Plymouth, MN, USA)
Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
Herolab Laborgeräte (Wiesloch)
Selbstbau Medizintechnik Universitätsklinikum Essen (Essen)
Zeiss (Oberkochen)
Leica (Wetzlar)
Leitz (Wetzlar)
Zeiss (Oberkochen)
Reichert-Jung (Heidelberg)
Biometra (Göttingen)
Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Eppendorf (Hamburg)
Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Applied Biosystems (Weiterstadt)
Bio-Rad (München)
NuAire (Plymouth, MN, USA)
Bio-Rad (München)
Oregon Scientific (Neu-Isenburg)
Schärfe System (Reutlingen)
Eppendorf (Hamburg)
Andreas Hettich (Tuttligen)

2.1.8 Software und Server

ABI Prism 7300
SPSS Software, Version 16.0
TINA 2.09g

BLAST
ExPASy Molecular Biology Server
PubMed

Applied Biosystems (Weiterstadt)
SPSS (Chicago, IL, USA)
raytest (Straubenhardt)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
<http://www.expasy.ch/tools>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Erstellung von humanen plazentaren Explant Kulturen

Die plazentaren Explant Kulturen wurden von humanem Plazentagewebe des ersten Trimesters nach einer modifizierten Methode von Genbacev et al. (1992) hergestellt. Das plazentare Gewebe wurde zunächst in einer Petrischale in eiskaltem PBS gewaschen und das Amnion und die Nabelschnur von dem Gewebe entfernt. Kleine Fragmente von plazentaren Zotten wurden von dem restlichen Plazentagewebe abgetrennt und in eine frische Petrischale mit eiskaltem PBS überführt. Die ausgewählten plazentaren Zotten wurden auf das Vorhandensein von Trophoblast Zellsäulen überprüft und solche mit ausgeprägten Trophoblast-Zellsäulen für die weitere Kultivierung verwendet. Jeweils eine plazentare Zotte wurde in einen Millicell-CM Kultureinsatz gegeben, welcher zuvor mit 0,2 ml unverdünntem Phenolrot-freiem Matrigel beschichtet worden war (Abb. 1.4) und in ein Well einer 24-Well-Platte gestellt worden war. Das Matrigel wurde vor dem Platzieren der plazentaren Zotte für 10 min in den Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37°C, 5% CO₂ und 20% O₂ gestellt, damit sich das Gel verfestigte. Die plazentaren Explants wurden in DMEM/F-12-Medium mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 100 µg/ml Normocin bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 3% O₂ für die hypoxische Behandlung kultiviert. Dabei wurden direkt nach der Platzierung des Explants 200µl Medium in das Well außerhalb des Kultureinsatzes gegeben. Am folgenden Tag, nachdem das Explant sich im Matrigel verfestigt hatte, wurden 200 µl Medium vorsichtig in den Zellkultureinsatz auf das Matrigel gegeben. Die Inkubation unter Kontrollbedingungen erfolgte bei 20% O₂, welches dem Sauerstoffgehalt der Luft entspricht, bzw. bei 8% O₂, welches dem physiologischen Sauerstoffgehalt der reifen Plazenta entspricht. Es wurden gleichzeitig jeweils 6 Explants pro Versuchsansatz, von Gewebe einer einzelnen Patientin, für 7 Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden jeweils von 2 Explants die mRNA oder die intrazellulären Proteine isoliert (s. 2.2.2.1, 2.2.3.1) und jeweils ein Explant für die Kryo- und eines für die Paraffin-Gewebeeinbettung verwendet (s. 2.2.1.2.1, 2.2.1.2.2). Jedes Experiment wurde mindestens mit Gewebe von fünf verschiedenen Patientinnen wiederholt.

2.2.1.2 Einbetten der plazentaren Explants

2.2.1.2.1 Paraffin-Gewebeeinbettung

Nach einwöchiger Inkubation der plazentaren Explants unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂) wurde das Medium aus den Kultureinsätzen und den Wells entnommen und die in den Kultureinsätzen befindlichen Explants in 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht (üN) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Am folgenden Tag wurden die Explants dreimal für 20 min mit PBS gewaschen und mittels einer Alkoholreihe von 70%, 80%, 90%, 95% und 3 x 100% Ethanol in Aqua dest. für jeweils 20 min entwässert. Im Folgenden wurden die Explants mit dem sie umgebenden Matrigel aus den Zellkultureinsätzen mittels Skalpell heraus geschnitten, in eine Einbettungskassette gegeben und dreimalig mit 100% Xylol für jeweils 20 min inkubiert. Anschließend erfolgten die Paraffinisierung mit heißem Paraplast Tissue Embedding Medium (60°C) für dreimal 20 min und die Gewebe-Einbettung. Die fertigen Paraffin-Gewebeblöcke wurden bei RT gelagert.

4% PFA: → 4 % (w/v) PFA in 100 ml erhitztem PBS lösen (pH 7,2 – 7,4)

2.2.1.2.2 Kryo-Gewebeeinbettung

Nach einwöchiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂) erfolgte die Fixierung der plazentaren Explants in 4% PFA üN bei 4°C. Nach der Fixierung wurden die Explants dreimal mit eiskaltem PBS für jeweils 20 min gewaschen, anschließend für 4 h in 5% Sucrose (in PBS) inkubiert und üN in 10% Sucrose plaziert. Am nachfolgenden Tag wurden die Explants in 15% Sucrose für 4 h und nachfolgend in einer 1:2 Verdünnung aus OCT und 20% Sucrose üN inkubiert. Die Explants wurden am nächsten Tag zusammen mit dem sie umgebenden Matrigel in OCT eingebettet und zur Aushärtung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Immunhistochemie der plazentaren Explants

2.2.1.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffin-Schnitten

Es wurden zunächst 5 µm Schnitte der Proben mit einem Mikrotom angefertigt und zum Deparaffinisieren dreimal für 5 min in 100% Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 2 min mit 100% und einmal für 2 min mit 95% Ethanol rehydriert und die endogene Peroxidase-Aktivität für 30 min mit 3% H₂O₂ in Methanol inhibiert. Es folgte die weitere Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe von 90, 80, 70 und 50% Ethanol mit jeweils zwei-minütiger Inkubation. Im Folgenden wurden die Proben für 5 min mit PBS gewaschen, für 15 min mit 4% PFA fixiert und mit einer HE-Färbung nach Shandon gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der alle basophilen Strukturen wie DNA und damit den Zellkern intensiv blau färbt. Der synthetische Farbstoff Eosin färbt dagegen alle azidophilen Zellstrukturen rot, zu denen die Proteine des Zytoplasmas gehören. Nach der HE-Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Histomount eingedeckt.

2.2.1.3.2 Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten

Die Schnitte wurden wie in 2.2.1.3.1 beschrieben deparaffiniert, rehydriert und fixiert. Die anschließende Antigendemaskierung erfolgte mit 0,015 % Triton X-100 in PBS für 10 min und das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit PBS + 2% BSA für 1 h. Die Inkubation mit dem primären Antikörper Maus anti Zytokeratin 7 (1:100, in PBS) erfolgte für 1,5 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde der sekundäre Antikörper Ziege anti Maus biotinyliert (1:300, in PBS) für 1 h auf die Schnitte gegeben, anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit Streptavidin-HRP für 30 min bei RT inkubiert. Danach folgten erneut zwei Waschschrte und die Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung aus DAB und H₂O₂. Die Schnitte wurden mit Aqua dest. gespült, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 2 x 100% für jeweils 2 min) dehydriert und in HistoClear gewaschen. Die fertigen Schnitte wurden mit Shandon Histomount eingedeckelt.

2.2.1.3.3 Immunhistochemie an Kryoschnitten

Es wurden 5 µm Schnitte der Proben mit einem Kryostaten angefertigt und für die längere Lagerung bei -80°C aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Immunhistochemie wurden die Schnitte aufgetaut, zweimal für 5 min mit PBS gewaschen, für 10 min mit 4% PFA fixiert und für 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Im Folgenden wurden die Schnitte zwischen jeder Inkubation dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Autofluoreszenz des Matrigels wurde durch die Inkubation mit 0,5% Sudan Black in 70% Ethanol für 15 s reduziert und die nicht-spezifischen Antikörperbindungen durch eine einstündige Inkubation mit der DAKO blocking solution blockiert. Die Schnitte wurden anschließend mit Antikörpern gegen humanes CYR61 oder NOV für 1,5 h bei RT oder üN bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper Esel anti Kaninchen Alexa Fluor® 488 bei RT. Nach der ersten Färbung wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen das humane HLA-G für eine Stunde bei 37°C, gefolgt von dem sekundären Antikörper Cy3-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG für 45 min bei RT, inkubiert (Tab. 2.1.3.1 und 2.1.3.2). Es folgte die Färbung des Zellkerns mit dem DNA-spezifischen Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Hydrochlorid (0,1 µg / ml in 100% Methanol) für 15 min bei 37°C, das Abspülen der Schnitte mit Aqua dest. und das Eindeckeln mit Mowiol. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop durchgeführt.

Mowiol: 1,3 M Glycerin; 28,6% (w/v) Mowiol 4-88; 33,3% (v/v) HPLC-H₂O; 66,7% (v/v) 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5); 0,1% (w/v) DABCO

2.2.1.4 Kultivierung der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3

In der vorliegenden Arbeit wurde die maligne Trophoblast-Zelllinie JEG3 kultiviert. Die Zelllinie wurde bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit 0,14 ml Medium pro cm² versorgt und kontinuierlich in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, damit eine kultivierungsbedingte Selektion von Zellklonen verhindert wurde. Die Versorgung der Zellen mit frischem Medium erfolgte dreimal in der Woche. Damit die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten werden konnten, wurden diese bei 70% Konfluenz passagiert.

JEG3-Medium: 500 ml MEM-EARLES w/o L-Glutamine; 10% (v/v) fötales Rinderserum; 2,4 mM L-Glutamin

2.2.1.5 Passagieren von Chorionkarzinomzellen

Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen entnommen und die Zellen mit 0,07 ml Moscona pro cm^2 für 30 s gewaschen. Anschließend wurde das Moscona wieder entnommen und die Zellen mit 0,014 ml Trypsin-EDTA pro cm^2 für 1-2 min inkubiert. Die Trypsin-Lösung bewirkt, dass sich die Zellen vom Untergrund ablösen, indem sie die Cadherine der Zellen spalten und diese somit den Kontakt zum Untergrund verlieren. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Reaktion gestoppt. Die Zelllösung wurde resuspendiert und am Untergrund verbleibende Zellen mit der Zellsuspension durch Spülen abgelöst. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen wurden diese in entsprechenden Verhältnissen passagiert.

Moscona (pH = 7,4): 140 mM NaCl; 9 mM D+ Glukose Monophosphat; 12 mM Natriumhydrogencarbonat; 4 mM KCl; 0,4 mM Natriumdihydrogenphosphat; 0,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; add 5 l Aqua dest. (autoklaviert) => Lösung steril filtrieren

2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CasyCounter

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsiniert und die Zellsuspension auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. 50 μl der Zellsuspension wurden für die Bestimmung der Zellzahl entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml CasyTon-Lösung gegeben. Die Messung der Zellzahl erfolgte anhand eines CasyCounters.

CasyTon-Lösung: 136 mM NaCl; 1 mM Dinatriumsalz; 5,4 mM KCl; 1,6 mM Natriumdihydrogenphosphat; 3,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 7,1 mM Natriumfluorid; add 5 l Aqua dest.

2.2.1.7 Einfrieren von Chorionkarzinomzellen

Zunächst wurden die Zellen mit 0,07 ml Moscona pro cm^2 gewaschen, mit 0,014 ml Trypsin pro cm^2 abgelöst und die Reaktion mit 0,14 ml frischem Medium pro cm^2 abgestoppt. Die

Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 110 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1,8 ml Medium aufgenommen, die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und nach Zugabe von 0,09 ml DMSO zunächst in Stickstoffdampf gegeben. Zur längeren Lagerung wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.8 Inkubation der JEG3-Zellen unter hypoxischen Bedingungen

Um die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV zu untersuchen, wurden die JEG3-Zellen unter 1% O₂ kultiviert. Zur Versuchsvorbereitung wurde zunächst die Anzahl von Zellen aus 2 Zellkulturflaschen der Größe 75 cm² mit einer Konfluenz von 70 – 80% bestimmt. Anschließend wurden jeweils 3 x 10⁵ Zellen pro 35 mm Zellkulturschale einer 6-Well Platte und 5 x 10⁵ Zellen pro 60mm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 2 ml Medium unter den Standard-Kulturbedingungen von 20% O₂ kultiviert. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml frisches Medium hinzu gegeben. Die Hälfte der 35 mm und 60 mm Zellkulturschalen wurde unter 1% O₂, die andere Hälfte als Kontrolle unter 20% O₂ in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Das hypoxische Milieu wurde durch einen Heraeus Inkubator mit regulierbarer Stickstoffzufuhr erreicht. Die Entnahme des Zellkulturüberstandes, die Isolation der Gesamt-RNA und der Proteine erfolgten nach 4, 8 und 24 h (s. 2.2.2.2 und 2.2.3.2). Jeder Versuchsdurchlauf wurde dreimal wiederholt.

2.2.1.9 Immunzytochemie

Um die Lokalisation von CYR61 und NOV in den JEG3-Zellen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen zu untersuchen, wurden Doppelinkubationen mit Antikörpern gegen CYR61 und NOV durchgeführt. Die Zellen wurden auf Deckplättchen ausplattiert und wie unter 2.2.1.5 beschrieben inkubiert. Nach jeweils 4-, 8-, und 24-stündiger Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für 10 min fixiert. Nach zwei 5-minütigen Waschschritten mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit PBT (PBS + 0,1% Triton X-100) permeabilisiert, für 5 min erneut gewaschen und für 1 h mit PBT + 2% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach der Blockierung erfolgte

zunächst die Inkubation mit dem ersten primären Antikörper Kaninchen anti humanes CYR61 gesamt (1:50, in PBS) für 1,5 h bei RT oder üN bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen mit dem ersten sekundären Antikörper Ziege anti Kaninchen Cy3-konjugiert (1:100, in PBS) für 45 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper Ziege anti humanes NOV (1:50) und dem zweiten sekundären Antikörper Esel anti Ziege Alexa Fluor[®]488 (1:200) wie oben beschrieben. Nach der Antikörperinkubation erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 5 min mit PBS und die Färbung des Zellkerns DAPI (0,1 µg / ml in 100% Methanol) für 15 min bei 37°C. Die Schnitte wurden kurz mit Aqua dest. abgespült und mit Mowiol eingedeckelt. Ein Präparat wurde als Negativkontrolle verwendet, wobei der Primärantikörper durch PBS ersetzt und das Präparat nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop.

2.2.1.10 Kultivierung der JEG3-Zellen mit DMOG

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe sollte analysiert werden, ob die Regulation von CYR61 und NOV unter Hypoxie tatsächlich auf die hypoxischen Bedingungen zurück zu führen ist. Daher wurde der Prolylhydroxylase-Inhibitor Dimethyloxallylglyzin (DMOG) ausgewählt, welcher den, durch die Prolylhydroxylasen induzierten, HIF-1 α -Abbau unter 20% O₂ inhibieren kann. Dadurch wird das HIF-1 α -Protein auch unter 20% O₂ stabilisiert und damit eine Hypoxie simuliert.

Es wurden zunächst 3 x 10⁵ Zellen pro 35 mm Zellkulturschale einer 6-Well Platte und 5 x 10⁵ Zellen pro 60mm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 2 ml Medium üN in einer Atmosphäre von 5% CO₂, einer Temperatur von 37°C und 20% O₂ kultiviert. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml frisches Medium hinzu gegeben. Die Hälfte der 35 mm und 60 mm Zellkulturschalen wurde mit 1 mM DMOG (gelöst in PBS), die andere Hälfte als Kontrolle nur mit dem Lösungsmittel versetzt und unter 20% O₂ kultiviert. Die Entnahme des Zellkulturüberstandes und die Isolation der Gesamt-RNA und der Proteine erfolgten, wie bei der Inkubation der Zellen unter Hypoxie, nach 4, 8 und 24 h (2.2.2.2 und 2.2.3.2).

2.2.1.11 Inkubation der JEG3-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α

Mit Hilfe von siRNAs gegen HIF-1 α sollte geklärt werden, ob CYR61 und NOV direkt über HIF-1 α reguliert werden. Die siRNAs bestehen zunächst aus doppelsträngiger RNA (dsRNA), welche durch Transfektion in die Zelle gelangen. Im Zytoplasma der Zelle wird die dsRNA durch das Enzym *Dicer* in die einzelsträngige siRNA gespalten (Bernstein et al., 2001; Hamilton & Baulcombe, 1999). Der siRNA-Dicer Komplex rekrutiert zusätzliche Faktoren, um den *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) zu bilden, in welchem die einzelsträngige RNA eingebaut wird. Der RISC bindet nun mit Hilfe der eingebauten RNA komplementär an die Ziel-mRNA, wodurch der RISC mit seinen RNA-Helicase- und -Nuklease-Aktivitäten das Entwinden und Spalten der Ziel-mRNA bewirken kann (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Pham et al., 2004). Die siRNA-Versuche wurden anhand der Angaben von Frede et al. (2005) mit optimierten Bedingungen für die JEG3-Zellen durchgeführt. Die optimalen Bedingungen, d.h. die Konzentration der siRNA und des Transfektionsreagenz im Zellkulturmedium, konnten durch die Verwendung des BLOCK-iT Fluorescent Oligomers ermittelt werden. BLOCK-iT ist ein Fluorescein-markiertes dsRNA Oligomer, welches die gleiche Länge, Ladung und Konfiguration wie Standard siRNAs aufweist, jedoch nicht homolog zu irgendeiner bekannten Gensequenz ist. Die Transfektion der JEG3-Zellen erfolgte durch das Transfektionsreagenz INTERFERin. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an BLOCK-iT (5, 10, 20 nM) und INTERFERin (1:25, 1:50, 1:75) getestet. Die Transfektionseffizienz konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Auswertung der fluoreszierenden transfizierten Zellen überprüft werden. Die optimale Konzentration an siRNA betrug 20 nM; die von INTERFERin 1:50. Nach der Ermittlung der optimalen Konzentrationen an siRNA und Transfektionsreagenz wurden 3×10^5 Zellen pro 35 mm Zellkulturschale einer 6-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 2 ml Medium in einer Atmosphäre von 5% CO₂, einer Temperatur von 37°C und 20% O₂ kultiviert. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml frisches Medium hinzugegeben. Die Hälfte der 35 mm Zellkulturschalen wurde mit 20 nM der siRNA siGENOME duplex gegen humanes HIF-1 α (gelöst in 1 x siRNA Puffer) und die andere Hälfte als Kontrolle mit 20 nM siCONTROL Non-Targeting siRNA #2 (gelöst in 1 x siRNA Puffer) versetzt. Die mit siRNA und INTERFERin versetzten Zellen wurden für 24 h unter 20% O₂ kultiviert. Nachfolgend wurde das Zellkulturmedium entnommen und 1 ml frisches Medium ohne siRNA und Transfektionsreagenz zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Hälfte der Zellen unter Hypoxie (1% O₂), die andere Hälfte unter 20% O₂ für

4, 8, und 24 h. Die Entnahme des Zellkulturüberstandes, die Isolation der Gesamt-RNA und der Proteine erfolgte wie in Absatz 2.2.2.2 und 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.1.12 Behandlung der JEG3-Zellen mit rekombinantem TGF- β 3

Da bekannt ist, dass TGF- β 3 eine wichtige Rolle in der Trophoblast-Differenzierung spielt und zudem durch HIF-1 α reguliert wird (s. 1.4), wurde in dieser Versuchsreihe die Beteiligung von TGF- β 3 bei der Regulation von CYR61 und NOV untersucht. Dazu wurden 3×10^5 JEG3-Zellen mit rekombinantem TGF- β 3 behandelt und unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) kultiviert. Die Zellen wurden in einer 35 mm Zellkulturschale einer 6-Well Platte mit 2 ml Medium \bar{u} N in einer Atmosphäre von 5% CO₂, 37°C und 20% O₂ kultiviert. Das Medium wurde am nachfolgenden Tag abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Zu der Hälfte der Zellkulturschalen wurden die jeweiligen Konzentrationen an rekombinantem TGF- β 3 (gelöst in 0,5 mM Zitronensäure in PBS und 2 mg BSA/ml) gegeben, die andere Hälfte wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt. Nach Zugabe der Substanzen wurden die Zellen für 4, 8 und 24 h unter Hypoxie (1% O₂) kultiviert, anschließend der Zellkulturüberstand entnommen und die intrazellulären Proteine aus dem Zelllysats isoliert (2.2.3.2).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus plazentaren Explants

Die plazentaren Explants inklusive des sie umgebenden Matrigels wurden in 350 μ l TRK-Lysepuffer überführt und mittels eines Eppi-Pistills homogenisiert. Die homogenisierten Zellen wurden anschließend durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle (s. 2.2.2.1) lysiert und die Gesamt-RNA mittels des E.Z.N.A. total RNA Kits laut Herstellerangaben isoliert. Die gewonnene RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien

Das Medium der in 35 mm Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurde abgenommen, durch 350 µl TRK-Lysepuffer (E.Z.N.A. Total RNA Kit) ersetzt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Das Zelllysate wurde durch mehrfaches Resuspendieren durch eine Kanüle (Terumo 23G x 1; 0,6 x 25 mm, NEOLUS) nochmals lysiert, die Gesamt-RNA mittels des E.Z.N.A. total RNA Kits laut Herstellerangaben isoliert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA- und DNA-Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, wobei eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und 40 µg einzelsträngiger RNA/ml entspricht. Zur Bestimmung der Konzentration wurden in der Regel 2 µl der RNA- oder DNA-Lösung in 98 µl DEPC-H₂O verdünnt und die Konzentration anhand eines Eppendorf Photometers bestimmt.

2.2.2.4 Reverse Transkription

Vor der Reversen Transkription (RT) der RNA erfolgte ein DNase-Verdau der genomischen DNA. Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 17 µl DEPC-H₂O, 2 µl DNase I-Reaktionspuffer und 1 µl DNase I (1 U/µl) für 15 min bei RT inkubiert und im Folgenden die DNase I durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) inaktiviert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 65°C, zur Beseitigung der Sekundärstrukturen der RNA, denaturiert und die Reverse Transkription durch Zugabe des RT-Ansatzes für 1 h bei 37°C durchgeführt. Es folgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase und die Denaturierung des RNA/cDNA-Doppelstranges bei 95°C für 5 min.

RT-Ansatz:

12,5 µl	DEPC-H ₂ O
10 µl	5 x RT Puffer
2,5 µl	dNTP Mix
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	Oligo(dT) ₁₈ Primer (0,5 µg/µl)
1 µl	MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

2.2.2.5 PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Expressionswerte mit Hilfe einer quantitativen Real-time PCR, wurden cDNA-Standardreihen der zu untersuchenden Gene erstellt. Durch eine herkömmliche semi-quantitative PCR wurde die jeweilige cDNA amplifiziert und das Produkt, wie in Abschnitt 2.2.2.6 und 2.2.2.7 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Das nachfolgend aufgeführte Pipettierschema 1 und das Syntheseprogramm wurden für die folgenden Gene verwendet: β -Aktin, CYR61, HIF-1 α , NOV, TGF- β 3 und VEGF-A. In Pipettierschema 2 (nachfolgend aufgeführt) sind die Zusätze für die kompetitive PCR der PHD2 aufgelistet. Das Primer-Annealing der PHD2-PCR erfolgte bei 60°C und einer Zykluszahl von 32 Zyklen. Details der verwendeten Primer sind in Tab. 2.3 aufgelistet.

Pipettierschema 1:

4 μ l	cDNA
5 μ l	10 x PCR-Puffer
1,5 μ l	dNTP Mix
1 μ l	sense Primer (25 pmol/ μ l)
1 μ l	antisense Primer (25 pmol/ μ l)
0,5 μ l	DNA-Polymerase Biotherm (5 U/ μ l)
37 μ l	HPLC-H ₂ O

Pipettierschema 2:

2 μ l	cDNA
2,5 μ l	10 x PCR-Puffer
1 μ l	dNTP Mix
0,4 μ l	sense Primer β -Aktin (25 pmol/ μ l)
0,4 μ l	antisense Primer β -Aktin (25 pmol/ μ l)
0,08 μ l	sense Primer PHD2 (25 pmol/ μ l)
0,08 μ l	antisense Primer PHD2 (25 pmol/ μ l)
0,25 μ l	DNA-Polymerase Biotherm (5 U/ μ l)
18,21 μ l	HPLC-H ₂ O

Syntheseprogramm:

94°C	2 min	initiale Denaturierung	
94°C	2 min	Denaturierung	} 37 Zyklen
59°C	1,5 min	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	
72°C	20 min	finale Elongation	

2.2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Die für die quantitative Real-time PCR (s. 2.2.2.8) benutzten Oligonukleotide wurden anhand eines 2%igen TBE-Agarosegels auf ihre Spezifität, d.h. die spezifische Größe des amplifizierten Fragments, überprüft. Zudem wurden die Amplifikationsprodukte, welche für die Standardkurven benutzt werden sollten, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.2.7). Als Ladepuffer wurde die 6 x Orange Loading Dye Solution benutzt und die Größe der Produkte anhand des Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus (0,1 µg/µl) überprüft.

Agarosegel (2%): 2% (w/v) Agarose; 100% (v/v) 1 x TBE-Puffer (pH 8,2); 0,005% (v/v) EtBr (10 mg/ml)

1 x TBE-Puffer (pH 8,2): 89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA

2.2.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Bande wurde fragmentnah aus dem Agarose-Gel geschnitten und die DNA mit Hilfe des MinElute Gel Extraktion Kits laut Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert.

2.2.2.8 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Die verwendeten Mengen-, Zeit- und Temperaturangaben sind unten aufgeführt, die benutzten Oligonukleotide sind in Tab. 2.1.4 ersichtlich. Die PCR umfasste die Inkubation der Proben mit dem ROX™ Farbstoff, einer internen passiven Referenz, welche die nicht zu der PCR gehörigen Fluoreszenzschwankungen normalisiert. Es erfolgte die Quantifizierung der Genexpression von CYR61, HIF-1α, NOV, TGF-β3 und VEGF-A, dessen Normalisierung anhand der Genexpression des „House-Keeping“-Gens β-Aktin erfolgte. Die Schmelzkurven-Analyse ermöglichte die Bestimmung der Spezifität der PCR-Fragmente. Zur quantitativen Bestimmung der Expressionswerte wurden Standardkurven der spezifischen Produkte und von β-Aktin erstellt. Dazu wurde eine PCR mit Primern des jeweiligen Gens durchgeführt und aus dem cDNA-Produkt eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, und 0,1 fg cDNA hergestellt.

Ansatz:

10 µl	Power SYBR Green PCR Master Mix
0,15 µl	sense Primer (25 pmol/µl)
0,15 µl	antisense Primer (25 pmol/µl)
8,7 µl	DEPC H ₂ O
1 µl	cDNA Reaktionsansatz

Syntheseprogramm:

50°C	120 s	ROX™ Farbstoff Inkubation	
95°C	600 s	initiale Denaturierung	
95°C	15 s	Denaturierung	} 45 Zyklen
60°C	60 s	Annealing und Elongation	
95°C	15 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
95°C	15 s	DNA-Stränge aufschmelzen, gleichzeitige Fluoreszenzmessung	
Lagerung der Amplifikate bei 4°C			

2.2.3 Biochemische Methoden**2.2.3.1 Proteinextraktion aus Primärgewebekulturen**

Die plazentaren Explants wurden mit dem sie umgebenden Matrigel aus den Kultureinsätzen mit Hilfe eines Skalpells geschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl RIPA-Puffer (Proteinlysepuffer) überführt. Die Homogenisierung des Gewebes und der sich im Matrigel befindlichen Zellen erfolgte mittels Ultraschall bei einer Frequenz von 12,5 Hz. Anschließend wurde das Zelllysate gevortext, für 20 min auf Eis inkubiert, erneut gevortext und bei 4°C und 2860 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer: 5 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,25% (v/v) Natrium-deoxycholat; 1 mM EDTA; add 50 ml Aqua dest.; 1 Tablette Proteasehemmer Inhibitor Complete EDTA-free

2.2.3.2 Proteinextraktion aus Zelllinien

Das Medium der in 35 mm Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurde abgenommen, durch 200 µl RIPA-Puffer (s. 2.2.3.1) ersetzt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Das Zelllysate wurde gevortext, für 20 min auf Eis inkubiert, erneut gevortext und bei 4°C und 2860 x g abzentrifugiert. Der Protein enthaltende Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Rotiquant Protein Assays laut Herstellerangaben nach einer Methode von Sedmak und Grossberg (1977), die auf der unspezifischen Anlagerung des Säurefarbstoffs Coomassie-Brillantblau-G250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen basiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine BSA-Standardreihe mit den Konzentrationen 1; 2,5; 5; 10 und 20 µg/µl angesetzt. Die Absorptionsmessungen erfolgten mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Konzentrationen wurden durch folgende Formel ermittelt: $((E_{Probe} / E_{Standard\ Mittelwert}) \times 500) / 1000 = \text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$.

2.2.3.4 SDS-PAGE

Die intrazellulären Proteine der plazentaren Explants (15 µg), die sekretierten Proteine aus den Zellkultur-Überständen (80 µg) und die intrazellulären Proteine aus den Zelllysaten (50 µg) der Zellkulturexperimente wurden mittels der SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) anhand ihrer Proteingröße aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die verwendeten Gele setzten sich aus dem 4%-igen Sammelgel und dem jeweiligen Trenngel zusammen. Für die gelelektrophoretische Auftrennung von HIF-1α wurden 7,5%-ige, für die Auftrennung von CYR61, NOV, TGF-β3 und VEGF-A 12%-ige Trenngele verwendet (s. unten). Die Proben wurden zur Denaturierung mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert, anschließend in die Geltaschen pipettiert und für ca. 30 min bei 80 V im Sammelgel laufen gelassen. Die Voltzahl wurde auf 150 V erhöht, als die Proben das Trenngel erreichten, und die Proben wurden bis zum Erreichen der untersten Gelgrenze aufgetrennt.

7,5% Trenngel:	55% (v/v) Aqua dest.; 25% (v/v) Lower Tris (1,5 M; pH 8,8); 18,8% (v/v) 30% Acrylamid; 1% (v/v) 10% APS; 0,2% (v/v) TEMED
12% Trenngel:	43,8% (v/v) Aqua dest.; 25% (v/v) Lower Tris (1,5 M; pH 8,8); 0,4% (w/v) SDS; 30% (v/v) 30% Acrylamid; 1% (v/v) 10% APS; 0,2% (v/v) TEMED
4% Sammelgel:	64,3% (v/v) Aqua dest.; 24,7% (v/v) Upper Tris (0,5 M; pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS; 10,6% (v/v) 30% Acrylamid; 0,3% (v/v) 10% APS; 0,1% (v/v) TEMED
4 x SDS-Ladepuffer:	20% (v/v) 1 M Tris HCl (pH 6,8); 27,7 µM SDS; 0,6 µM Bromphenolblau; 40% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 20% (v/v) Aqua dest.

2.2.3.5 Western Blot

Die in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blot-Gestelle wurden folgendermaßen aufgebaut: auf ein Fließ folgten zwei Lagen Whatman-Papier, das Polyacrylamid-Gel, die Nitrozellulosemembran (zuvor in Aqua dest. äquibriert), erneut zwei Lagen Whatman-Papier und ein weiteres Fließ. Die Fließe und das Whatman-Papier wurden zuvor mit Transferpuffer befeuchtet. Die Blot-Gestelle wurden in die Tank-Blot-Kammer (Bio-Rad, München) zusammen mit einer Kühleinheit gehängt, mit Transferpuffer bedeckt und ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld von 70 mA für 2 h bei RT angelegt. Das Blotten erfolgte von der Kathode zur Anode, wobei die aufgetrennten Proteine in Folge ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode auf die Nitrozellulosemembran wanderten und dort auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen haften blieben. Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden die Membranen mit TBS-T-Puffer gewaschen, um das für die Denaturierung der Proteine erforderliche β-Mercaptoethanol aus der Membran zu waschen, welches zur Folge hat, dass die Proteine wieder renaturieren und teilweise wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen können, jedoch nicht ihre Quartärstruktur. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der übertragenen Proteine mit Hilfe von Antikörpern.

TBS-T-Puffer (pH 7,6):	2 mM Tris; 13,7 mM NaCl; 0,015% (v/v) Tween 20; add 1 l Aqua dest.
-------------------------------	--

2.2.3.6 Antikörper-Inkubation

Die Nitrozellulosemembranen wurden zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% (w/v) fett-freier Milch in TBS-T für 1 h bei RT inkubiert und jeweils mit den primären Antikörper gegen CYR61, HIF-1 α , NOV, TGF- β 3 und VEGF-A (Tab. 2.1) für 1,5 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Es folgten ein zweimaliger Waschschrift mit TBS-T für 5 min und ein Waschschrift für 15 min bei RT. Im Anschluss wurden die Membranen mit den HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern (s. Tab. 2.2) für 45 min bei RT inkubiert und erneut zweimal für 5 min und einmal für 15 min gewaschen. Die Antikörper wurden mit dem Pierce ECL Western Blotting Kit laut Herstellerangaben und X-Ray Filmen detektiert. Die Normalisierung der intrazellulären Proteinexpression erfolgte durch die Inkubation der Membranen mit β -Aktin, die der sekretierten mit BSA als Zusatz im Kulturmedium. Dazu wurden die ersten primären Antikörper nach der Detektion mit Stripping-Puffer für 15 min bei 60°C von der Membran gelöst, die Membran zweimal für 10 min gewaschen und nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit dem zweiten primären und sekundären Antikörper inkubiert. Für jeden experimentellen Ansatz wurde ein Minimum von drei Western Blots durchgeführt.

2.2.3.7 Statistische und densitometrische Auswertungen der Expressionsdaten

Die densitometrischen Analysen der Proteinbanden erfolgten durch das Programm TINA 2.09g (Straubenhardt, Germany). Die statistischen Analysen der Expressionswerte wurden anhand des Statistikprogramm-Pakets SPSS 16.0 mit Hilfe des Mann-Whitney-Wilcoxon Test für nichtparametrische unabhängige 2-Gruppen Vergleiche für die Zellkulturexperimente und der abhängigen 2-Gruppen Vergleiche für die Experimente mit den plazentaren Explants durchgeführt. Das Quantil, welches mit p angegeben wird, wurde auf einen Wert von $p = 0,05$ festgelegt, wobei dieser Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angibt und als statistisch signifikant gilt.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der matrizellulären CCN-Proteine CYR61 und NOV im humanen Trophoblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der CCN-Proteine CYR61 und NOV im humanen Trophoblasten unter niedrigen Sauerstoffbedingungen hinsichtlich der Entstehung der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie untersucht. Da die favorisierte Theorie zur Entstehung der Präeklampsie eine verringerte Trophoblastinvasion während des ersten Trimesters der Schwangerschaft ist, wurde die Regulation von CYR61 und NOV unter Sauerstoffmangel in EVT-Zellen untersucht. Für die Untersuchungen wurden zum Einen das humane plazentare Explantmodell, welches die *in vivo* Situation simuliert, und zum Anderen die maligne Trophoblastzelllinie JEG3 eingesetzt.

3.1.1 Untersuchungen zur Regulation von CYR61 und NOV anhand des humanen plazentaren Explantmodells

Für das humane plazentare Explantmodell wurden Plazentagewebe des ersten Trimesters, zum Zeitpunkt des Schwangerschaftsabbruches zwischen der 6. und 9. SSW, verwendet und das Modell nach der Methode von Genbacev et al. (1992) etabliert.

3.1.1.1 Etablierung des humanen plazentaren Explantmodells

Das Explant besteht aus einer plazentaren Zotte, welche Trophoblastzellsäulen enthält. Die plazentaren Explants wurden unter Zellkulturbedingungen in einem Zellkultureinsatz auf Matrigel für eine Woche unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen kultiviert (s. 2.2.1.1). Das Matrigel, auf welches die plazentaren Explants gegeben wurden, sollte die Matrix der Dezidua repräsentieren, in welche die EVTs einwandern (s. Abb. 1.4). Die Experimente an den Explantkulturen wurden zum Einen unter geringen (3% O₂) und zum Anderen unter Standard-Kulturbedingungen (20% O₂) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle wurden die plazentaren Explants dem in der reifen Plazenta vorherrschenden physiologischen Sauerstoffgehalt von 8% O₂ (Fujikura und Yoshida, 1996; Schaaps et al., 2005) ausgesetzt.

3.1.1.2 Makro- und mikroskopische Analyse der plazentaren Explants

Nach einwöchiger Kultivierung der plazentaren Explants unter 3% O₂, 8% O₂ und 20% O₂ wurden diese zunächst makroskopisch betrachtet und das Ausmaß der Trophoblastinvasion überprüft. Eine verstärkte Invasion der EVT-Zellen in das Matrigel konnte nur in den unter 3% O₂ kultivierten Explants beobachtet werden (Abb. 3.1 A); die unter 8% O₂ und 20% O₂ kultivierten Explants zeigten keine bis unzureichende Invasion. Da sich beide Kontrollen von 8% O₂ und 20% O₂ gleich verhielten, wurde nur ein Explant nach einwöchiger Kultivierung unter 20% O₂ exemplarisch gezeigt (Abb. 3.1 B).

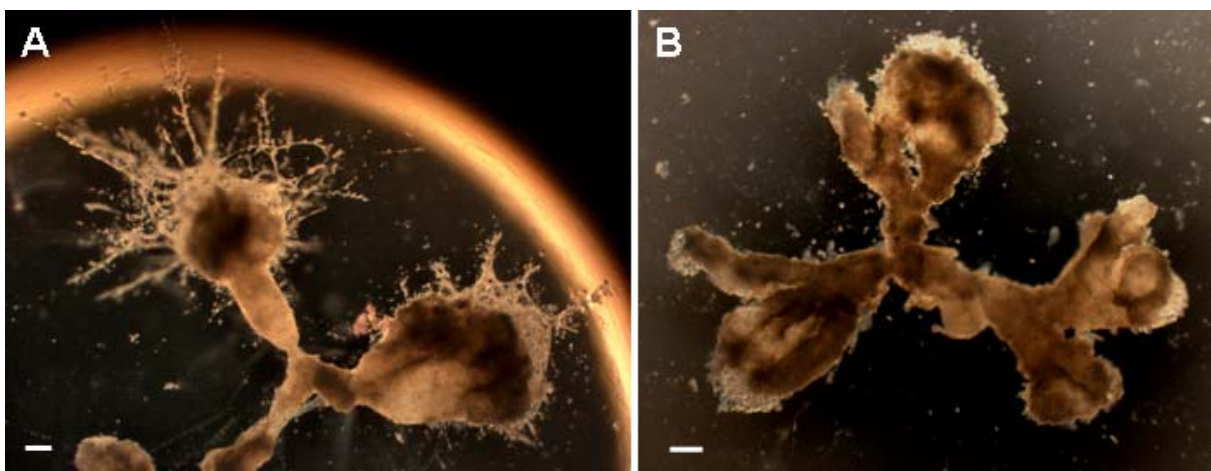


Abb. 3.1: Makroskopische Darstellung der humanen plazentaren Explants. A, Plazentares Explant des ersten Trimesters nach einwöchiger Inkubation unter 3% O₂. Es sind stark invasive Trophoblastzellverbände an den Spitzen der villösen Zotten zu erkennen. B, Plazentares Explant des ersten Trimesters nach einwöchiger Inkubation unter 20% O₂. Der Maßstabsbalken in A und B repräsentiert eine Größe von 400μm.

Nach der makroskopischen Analyse der Explants wurden Paraffin-Schnitte der unter 3% O₂ kultivierten plazentaren Explants angefertigt und diese mit einer HE-Färbung oder immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Zytokeratin 7 gefärbt (s. 2.2.1.3.1; 2.2.1.3.2), um die Invasion der Trophoblastzellen mikroskopisch zu untersuchen. Abb. 3.2 A zeigt eine HE-Färbung eines gesamten plazentaren Explants inkubiert unter hypoxischen Bedingungen. Es ist zu erkennen, dass EVT-Zellen in das Matrigel eingewandert sind. Eine genauere Darstellung der invadierten EVT-Zellen ist in Abb. 3.2 B und 3.2 C zu erkennen. Die Zellen sind mit dem Epithelzellmarker Zytokeratin 7 gefärbt und es sind vereinzelte, in das Matrigel invadierte Zellen zu erkennen (s. Pfeile in Abb. 3.2 C).

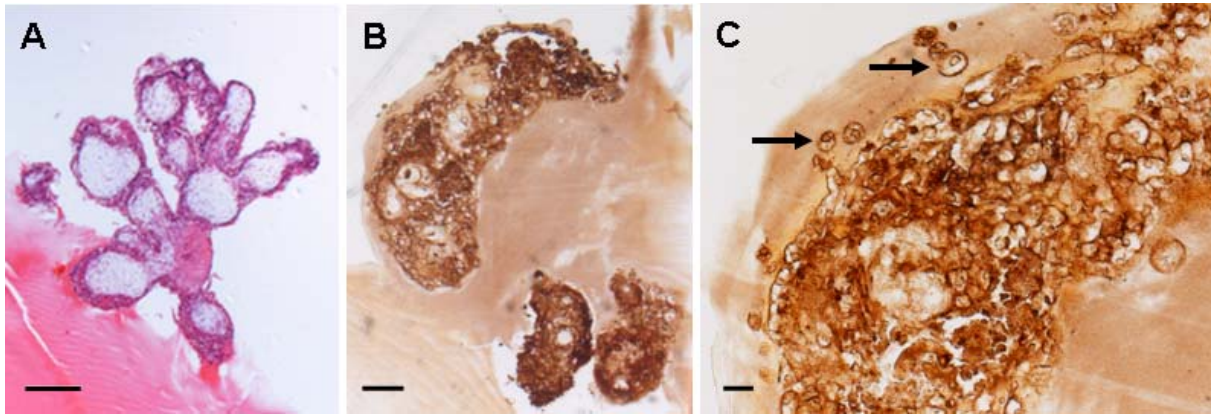


Abb. 3.2: Mikroskopische Darstellung und immunhistochemische Färbung des humanen placentaren Explants. A-C, HE- (A) und Zytokeratin 7- (B, C) Färbung von placentaren Explants nach einwöchiger Kultivierung unter 3% O₂. Die Maßstabsbalken in A-C repräsentieren eine Größe von 200 µm (A, B) und 100 µm (C).

3.1.1.3 Untersuchungen zur Lokalisation von CYR61 und NOV in humanen placentaren Explants

Die humanen placentaren Explants des ersten Trimesters wurden für eine Woche unter 3% O₂ kultiviert und anschließend eine Ko-Immunhistochemie gegen CYR61 oder NOV mit Zytokeratin 7 und sekundären Fluorescein-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Der Epithelmarker Zytokeratin 7 sollte die beiden äußeren Schichten des placentaren Explants markieren, den Synzytiotrophoblasten und den Zytotrophoblasten. Die immunhistochemischen Untersuchungen sollten zunächst klären, ob die beiden CCN-Proteine in den Zytotrophoblastzellen, welche später den invasiven Trophoblasten bilden (s. 1.1.2), exprimiert werden. Abb. 3.3 zeigt die Lokalisation von CYR61 (A) und NOV (B) an der Invasionsfront eines placentaren Explants.

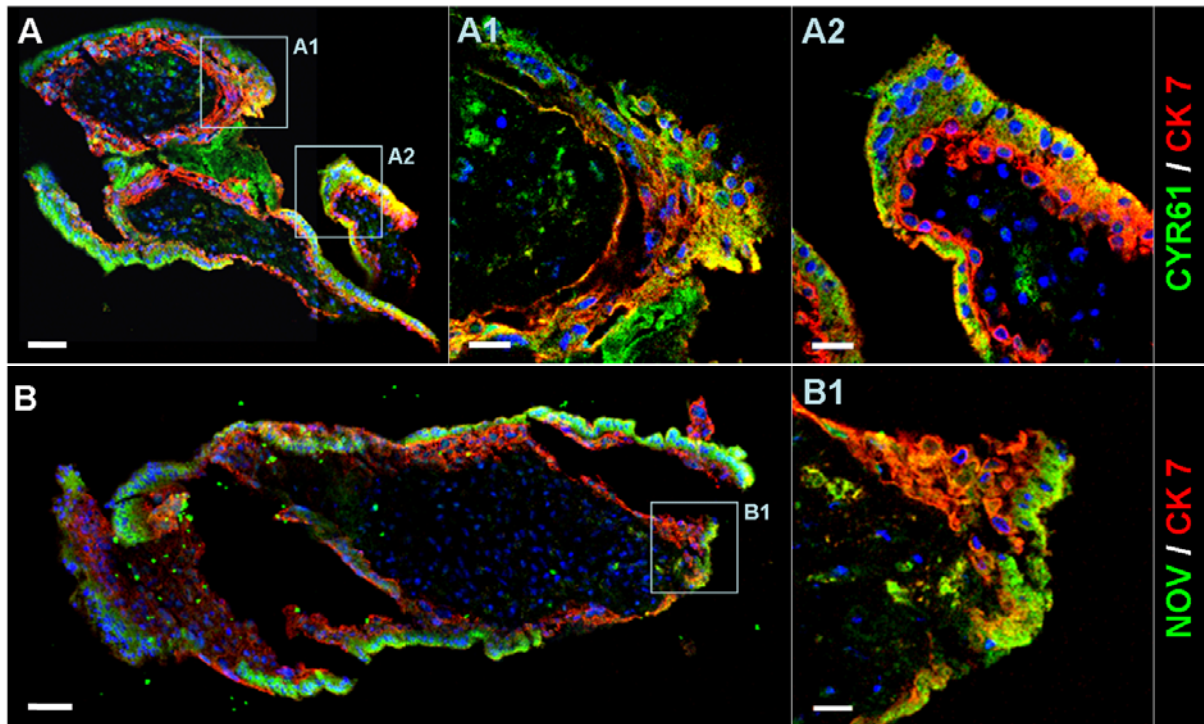


Abb. 3.3: Lokalisation von CYR61 und NOV im humanen placentaren Explantmodell. A; B, Doppel-Immunfärbung von CYR61 (grün) mit Zytokeratin 7 (rot) (A) und NOV (grün) mit Zytokeratin 7 (rot) (B) in placentaren Explants nach einer einwöchigen Kultivierung unter 3% O₂. Die Abbildungen A1, 2 und B1 zeigen Ausschnitte mit einer höheren Vergrößerung der Invasionsfront. Die Maßstabsbalken repräsentieren eine Größe von: 50 µm (A, B) und 16 µm (Ausschnitte).

Eine Untersuchung der einzelnen, in das Matrigel invadierten Trophoblastzellen und der gesamten Trophoblastzellsäule erfolgte anhand von Ko-Immunhistochemien mit CYR61 oder NOV und HLA-G, welches ein Markerprotein für EVT-Zellen darstellt. Die Immunfluoreszenz konnte eine Ko-Lokalisation von CYR61 und NOV und HLA-G (Abb. 3.4) an der Invasionsfront und in den invadierten EVT-Zellen des placentaren Explants nachweisen. Die CYR61- und HLA-G-positive Färbung war hauptsächlich in den EVT-Zellen der Zellsäule und in bereits abgelösten, in das Matrigel invadierten EVT-Zellen (Abb. 3.4, Ausschnitt) zu erkennen. Die Immunfärbung von NOV und HLA-G war hauptsächlich an den äußeren EVT-Zellen der Zellsäule (s. Abb. 3.4 B, Ausschnitt) und in bereits abgelösten EVT-Zellen (Abb. 3.4 B, linke Seite) zu erkennen.

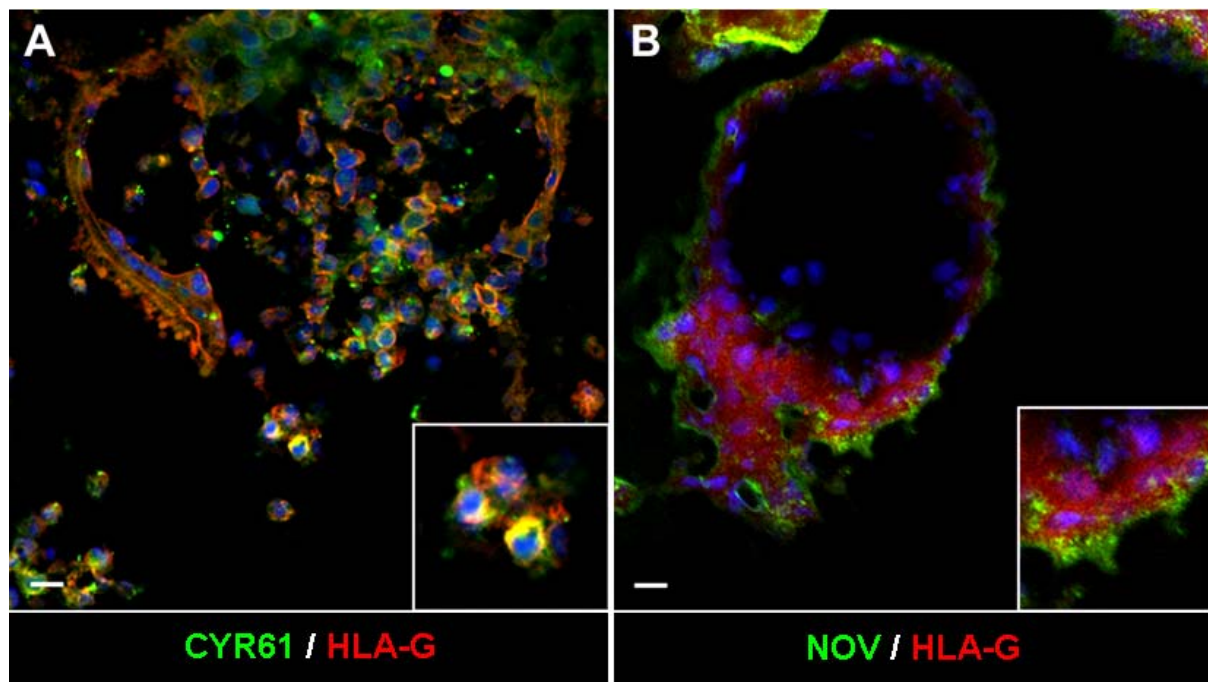


Abb. 3.4: Lokalisation des CYR61 und NOV Proteins in humanen placentaren Explants des ersten Trimesters. A; B, Doppel-Immunfärbung von CYR61 (grün) mit HLA-G (rot) (A) und NOV (grün) mit HLA-G (rot) (B) in placentaren Explants nach einer einwöchigen Kultivierung unter 3% O₂. CYR61, NOV und HLA-G sind in den EVT-Zellen ko-lokalisiert mit gesteigerter Expression der beiden CCN Proteine an der Invasionsfront. Die Ausschnitte in A und B zeigen eine höhere Vergrößerung der in das Matrigel invadierten Zytotrophoblastzellen. Der Maßstabsbalken in A und B repräsentiert eine Größe von 25 µm.

3.1.1.4 Sauerstoff-abhängige Regulation von CYR61 und NOV in humanen placentaren Explants des ersten Trimesters

Für die Expressionsanalyse von CYR61 und NOV wurden die placentaren Explants für eine Woche unter 3% O₂ und 8% O₂ bzw. 20% O₂ kultiviert. Anschließend wurden die gesamten Explants inklusive der invadierten EVT-Zellen und des sie umgebenden Matrigels isoliert und entweder für die mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-time PCR oder die der intrazellulären Proteine mittels Western Blot verwendet. Die Quantifizierung der mRNA-Expression und des intrazellulären Proteins von CYR61 und NOV wurde zu der konstanten Expression des House-Keeping-Gens β -Aktin normalisiert. Die daraus resultierenden Expressionswerte der unter 3% O₂ kultivierten JEG3-Zellen wurden zusätzlich zu den Expressionswerten unter 8% O₂ bzw. 20% O₂ normalisiert. Die Expressionswerte der unter 8% O₂ bzw. 20% O₂ kultivierten Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt und der Quotient aus der Expression bei 3% O₂ und 8% O₂ bzw. 20% O₂ graphisch aufgetragen.

Die Analyse der CYR61-Expression bei 3% O₂ im Vergleich zu 20% O₂ zeigte sowohl eine Hochregulation auf mRNA-Ebene als auch des intrazellulären Proteins (Abb. 3.5 A). Die NOV-Transkripte zeigten einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression als auch der intrazellulären Protein-Expression unter 3% O₂ (Abb. 3.5 B).

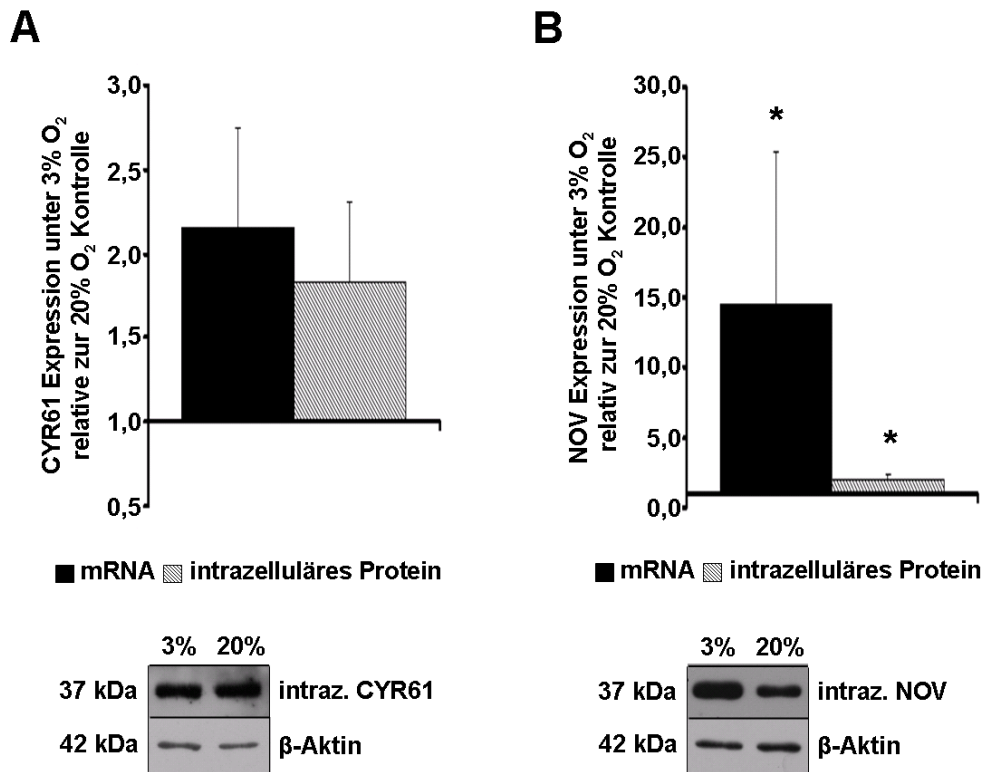


Abb. 3.5: Vergleichende Regulation von CYR61 und NOV in placentaren Explants des ersten Trimesters unter 3% O₂ im Vergleich zu 20% O₂. A, B, Densitometrische Analyse der CYR61- (A) und NOV- (B) mRNA und des intrazellulären Proteins in placentaren Explants inkubiert unter 3% O₂. Unter den Grafiken sind exemplarische Immunblots dargestellt. Die Level der mRNA- und Protein-Expression sind zu der konstanten Expression von β-Aktin normalisiert. Die Werte der mRNA- und Protein-Quantifizierung sind als Mittelwerte der Expressionslevel unter 3% O₂ relativ zu den 20% O₂-Kontrollen dargestellt. CYR61: mRNA n = 14, Protein n = 13; NOV: mRNA n = 12, Protein n = 11. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von n unabhängigen Proben und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zu der 20% O₂-Kontrolle).

Die mRNA-Expression von CYR61 nach einwöchiger Kultivierung unter 3% O₂ im Vergleich zu der 8% O₂-Kontrolle zeigte einen signifikanten Anstieg, wobei der intrazelluläre Proteinlevel ebenfalls erhöht, jedoch nicht signifikant hochreguliert war (Abb. 3.6 A). Die Expression der NOV-mRNA und des intrazellulären Proteins war in beiden Fällen signifikant hochreguliert (Abb. 3.6 B).

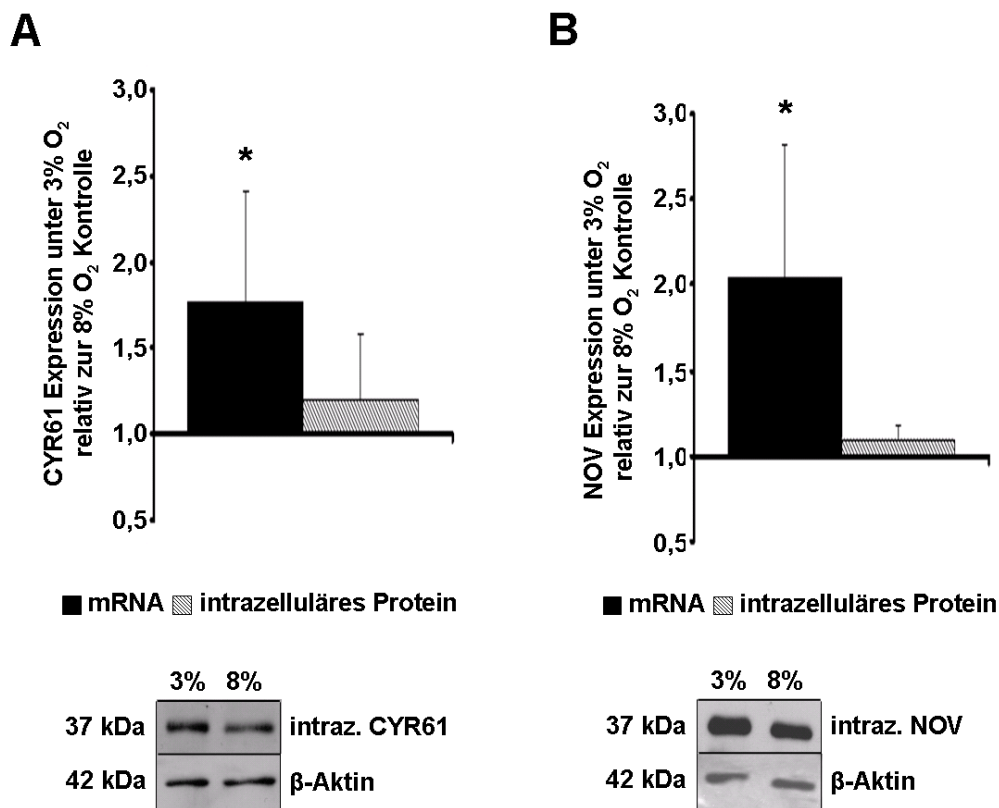


Abb. 3.6: Regulation von CYR61 und NOV in placentaren Explants des ersten Trimesters unter 3% O₂ im Vergleich zu dem physiologischem Sauerstoffgehalt in der reifen Plazenta (8% O₂). A, B, Densitometrische Analyse der CYR61- (A) und NOV- (B) mRNA und des intrazellulären Proteins in placentaren Explants inkubiert unter 3% O₂ verglichen zu 8% O₂ und exemplarischer Immunblot. Die zu β-Aktin normalisierten Werte der mRNA- und Protein-Quantifizierung sind als Mittelwerte der Expressionslevel unter 3% O₂ relativ zu der 8% O₂-Kontrolle dargestellt. mRNA und Protein n = 5. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von n unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zu der 8% O₂-Kontrolle).

Zusammenfassend konnte eine Hochregulation beider CCN-Moleküle unter 3% O₂ in humanen placentaren Explants des ersten Trimesters nachgewiesen werden. Diese Regulation war unabhängig von der Normalisierung zu den beiden Kontrollen, 20% O₂ oder physiologischer Sauerstoffgehalt in der reifen Plazenta (8% O₂).

3.1.2 Untersuchungen zur hypoxischen Regulation von CYR61 und NOV in der humanen Trophoblast-Zelllinie JEG3

3.1.2.1 Lokalisationsuntersuchungen von CYR61 und NOV in JEG3-Trophoblastzellen unter 20% O₂ und Hypoxie

Die maligne Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3, welche den invasiven Trophoblasten repräsentiert, wurde verwendet, um die hypoxische Regulation der beiden CCN-Moleküle *in vitro* zu untersuchen. Die in der Abb. 3.7 dargestellte Immunzytochemie zeigt eine deutliche Expression von CYR61 und NOV in den JEG3-Zellen sowohl unter 20% O₂ als auch unter hypoxischen (1% O₂) Bedingungen. Die Zellen wurden zuvor für 4, 8 und 24 h unter 20% O₂ oder Hypoxie kultiviert und anschließend immunzytochemisch gefärbt. Eine Veränderung der Lokalisation war nur nach 8 h unter Hypoxie zu beobachten.

Es ist zu erkennen, dass CYR61 unter 20% O₂ eine starke Expression im Nukleus und im Speziellen im Chromatin aufweist mit geringerer Verteilung im Zytoplasma (Abb. 3.7 A). Die Inkubation der Zellen unter Hypoxie bewirkte eine stärkere Lokalisation an der Nukleusmembran, jedoch war CYR61 auch noch im Nukleus und geringfügig im Zytoplasma exprimiert (Abb. 3.7 C). Eine Lokalisationsänderung ist auch bei dem NOV-Protein zu erkennen, jedoch stärker ausgeprägt verglichen zum CYR61-Protein. Unter 20% O₂ war NOV stark im Nukleus und, ähnlich wie bei dem CYR61-Protein, im Chromatin exprimiert im Vergleich zur Expression im Zytoplasma (Abb. 3.7 B). Die Änderung der Sauerstoffbedingungen, d.h. die Inkubation unter Hypoxie, bewirkte eine Lokalisationsänderung des NOV-Proteins in den Zellen. Unter Hypoxie war NOV stark an der Nukleusmembran lokalisiert, mit geringer bis nicht erkennbarer Expression im Nukleus und einer diffusen Verteilung im Zytoplasma (Abb. 3.7 D).

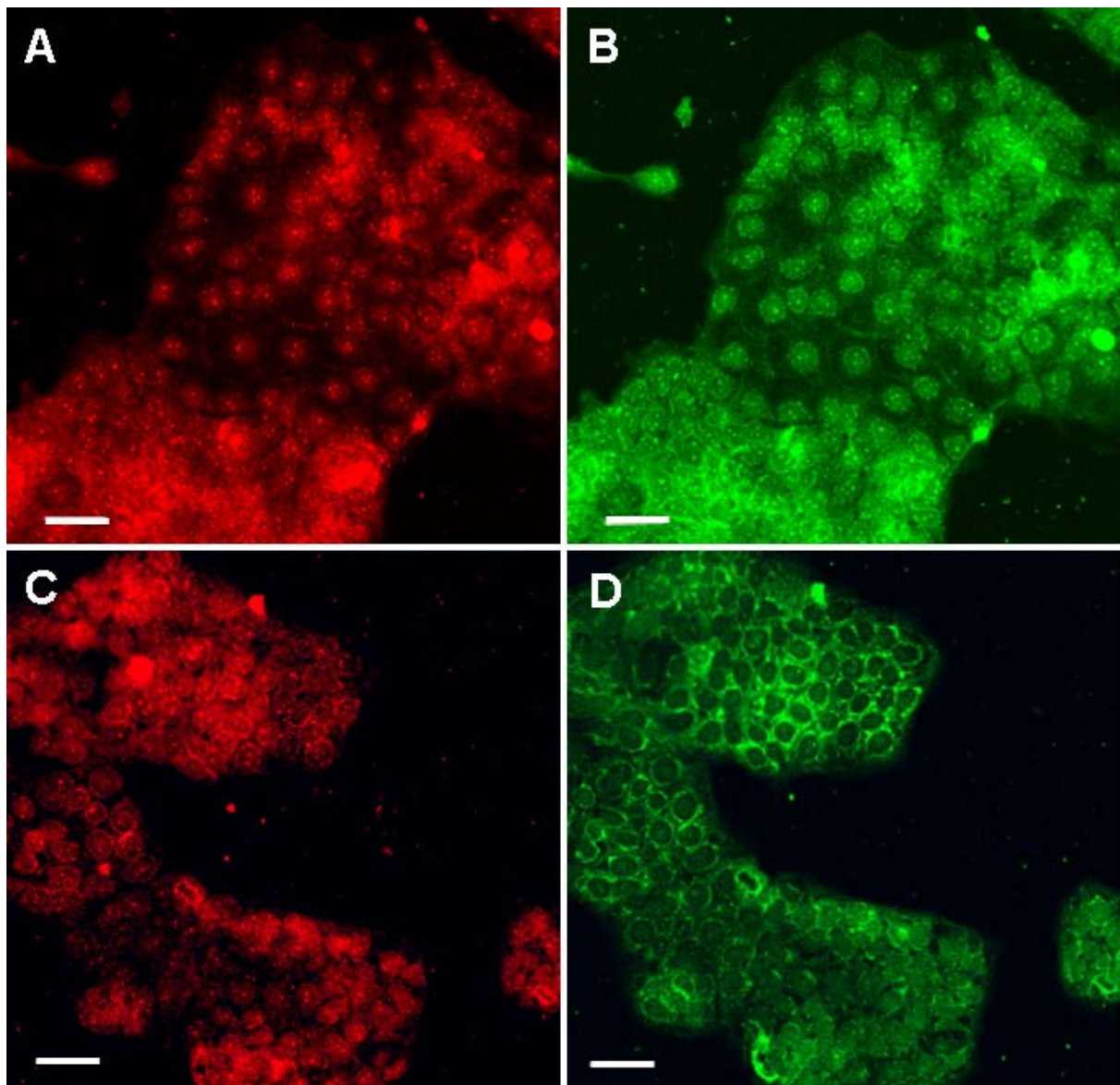


Abb. 3.7: Lokalisation von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen. A, B, Ko-Immunzytochemie von CYR61 (rot, A) und NOV (grün, B) in JEG3-Zellen inkubiert für 8 h unter 20% O₂. C, D, Ko-Immunzytochemie von CYR61 (rot, C) und NOV (grün, D) in JEG3-Zellen inkubiert für 8 h unter Hypoxie (1% O₂). Die Maßstabsbalken in A-D repräsentieren eine Größe von 50μm.

3.1.2.1.1 Reaktivität des Zellkultursystems auf das hypoxische Milieu

Die JEG3-Zellen wurden über eine Zeitspanne von 24 h entweder unter 20% O₂ oder Hypoxie (1% O₂) kultiviert und die Expression der beiden CCN-Moleküle mittels quantitativer Real-time PCR und Western Blot ermittelt. Auf Proteinebene wurde sowohl die intrazelluläre als auch die Expression von sezerniertem CYR61 und NOV hinsichtlich ihrer hypoxischen Regulation untersucht. Die Reaktivität des Zellkultursystems auf Hypoxie wurde im Folgenden zunächst durch den Nachweis der HIF-1α-Stabilisierung überprüft. HIF-1α ist

ein Hypoxie induzierter Faktor, der unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird und dadurch mittels Western Blot detektiert werden kann. Die Protein-Expression von HIF-1 α wurde nach 4, 8 und 24 h unter Hypoxie bestimmt und der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Wie in Abb. 3.8 A ersichtlich wird, akkumulierte das HIF-1 α -Protein bereits nach 4 h unter Hypoxie und blieb während der gesamten Versuchsspanne bis zu 24 h stabil. Als zusätzliche Kontrolle für das hypoxische Milieu in der Zellkultur diente der Nachweis der mRNA-Expression von VEGF-A, dessen Transkription durch Hypoxie gesteigert wird (Gleadle et al., 1995; Shore et al., 1997). Die mRNA-Expression von VEGF-A wurde mittels quantitativer Real-time PCR ermittelt. Abb. 3.8 B zeigt die signifikante Hochregulation der VEGF-A-mRNA nach 4, 8 und 24 h unter Hypoxie, normalisiert zu der Expression unter 20% O₂.

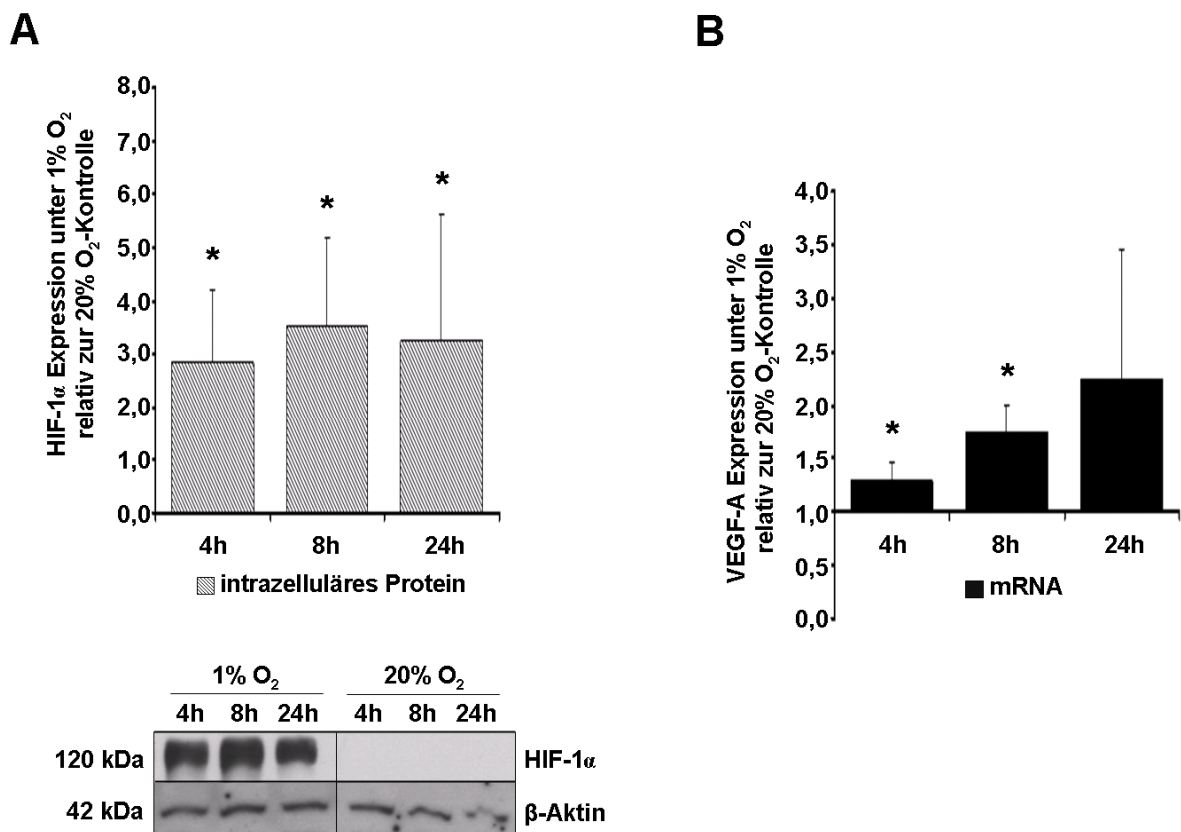


Abb. 3.8: Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins und Expression von VEGF-A unter Hypoxie. A, Densitometrische Analyse und Immunblot der HIF-1 α -Expression in JEG3-Zellen nach 4-, 8- und 24-stündiger Inkubation unter 1% O₂. Die Expressionswerte von HIF-1 α sind zu den Expressionswerten von β -Aktin normalisiert. B, Graphische Darstellung der VEGF-A-mRNA-Expression in JEG3-Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Die zu β -Aktin normalisierten Werte der mRNA-Quantifizierung sind als Mittelwerte der Expressionslevel unter Hypoxie (1% O₂) relativ zu 20% O₂ dargestellt. Dabei wurden die Expressionslevel von VEGF-A unter 20% O₂ auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0,05$ (gemessen im Vergleich zu 20% O₂).

3.1.2.1.2 Expressionsuntersuchungen von CYR61 und NOV unter Hypoxie

Die JEG3-Zellen wurden für 4, 8 oder 24 h unter Hypoxie (1% O₂) oder 20% O₂ kultiviert. Anschließend wurden die Gesamt-RNA und die intrazellulären Proteine isoliert und der Zellkulturüberstand für den Nachweis von sekretierten Proteinen verwendet (s. Material und Methoden 2.2.2.2 und 2.2.3.2). Die Ermittlung der Expression erfolgte mittels quantitativer Real-time PCR und Western Blots. Die Quantifizierung der Expression der CYR61- und NOV-mRNA und des intrazellulären Proteins wurde zu der Expression des House-Keeping-Gens β -Aktin normalisiert, die Expression der sekretierten Proteine zu dem konstanten Gehalt des im Zellkulturmedium enthaltenen BSA. Die Expressionswerte der unter Hypoxie kultivierten JEG3-Zellen wurden zusätzlich zu den Expressionswerten unter 20% O₂ normalisiert. Die Expressionswerte der unter 20% O₂ kultivierten Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt und der Quotient aus hypoxischer Expression und der unter 20% O₂ ermittelten Expression graphisch aufgetragen.

Die CYR61-mRNA war signifikant 1,4-fach hochreguliert nach 8 h unter hypoxischen Bedingungen mit einer nachfolgenden Herunterregulation nach 24 h unter Hypoxie (Abb. 3.9 A). Die Western Blot-Analyse zeigte eine starke 8,8-fache transiente Hochregulation des intrazellulären CYR61-Proteins nach 8 h unter Hypoxie, gefolgt von einer leichten Herunterregulation nach 24 h, wobei die nach 8 h signifikant erhöhte Sekretion von CYR61 auch noch nach 24 h unter Hypoxie signifikant erhöht blieb (Abb. 3.9 B, C). Die NOV-mRNA-Expression war nur leicht verändert, mit einem Anstieg der Expression nach 4 h und einer nochmaligen Hochregulation nach 8 h unter Hypoxie (Abb. 3.10 A). Die intrazelluläre Protein-Expression von NOV zeigte ein vergleichbares Muster zu der CYR61-Expression, wobei NOV eine stärkere signifikante 25-fache transiente Hochregulation nach 8 h unter Hypoxie zeigte und die Sekretion nach einem leichten Anstieg nach 24 h unter Hypoxie signifikant hochreguliert war (Abb. 3.10 B, C).

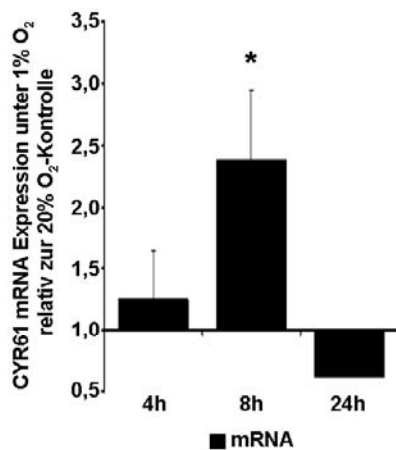
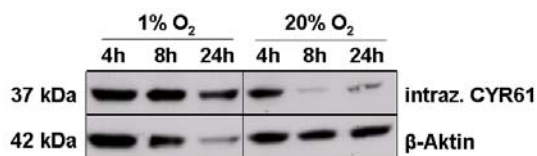
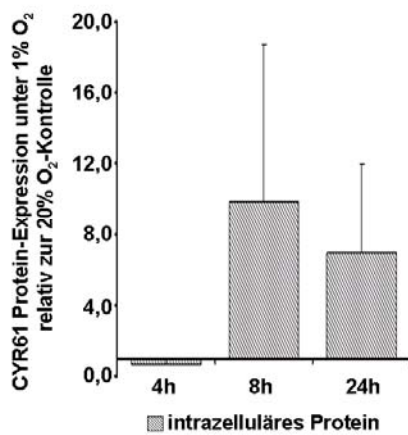
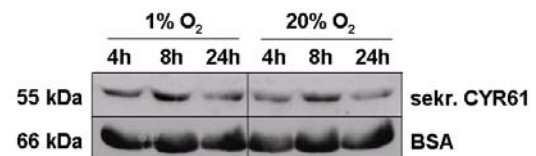
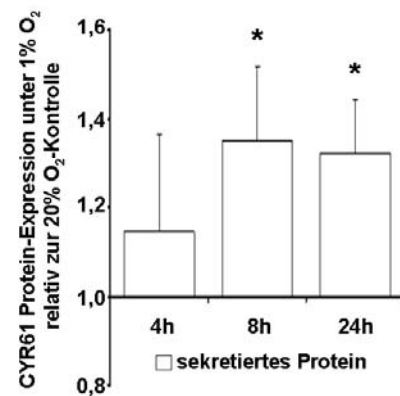
A**B****C**

Abb. 3.9: Anstieg der CYR61-Expression unter hypoxischen Bedingungen. A-C Densitometrische Analyse der CYR61-mRNA (A), der intrazellulären (B) und sekretierten (C) Protein-Expression mit Immunblots in JEG3-Zellen gemessen nach 4, 8 und 24 h unter Hypoxie (1% O₂). Die Level der mRNA- und der intrazellulären Protein-Expression sind normalisiert zu der β-Aktin Expression, die des sekretierten Proteins zu BSA, welches im Zellkulturmedium enthalten ist. Die Werte der mRNA- und Protein-Quantifizierung sind als Mittelwerte der Expression unter Hypoxie relativ zu 20% O₂ dargestellt. Die Expressionslevel von CYR61 unter 20% O₂ wurden auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0,05$ (gemessen im Vergleich zu 20% O₂).

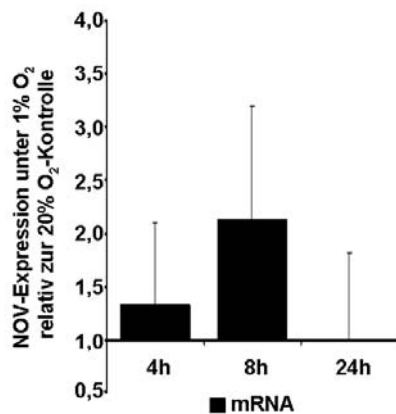
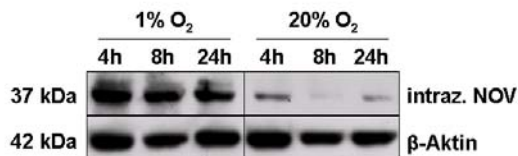
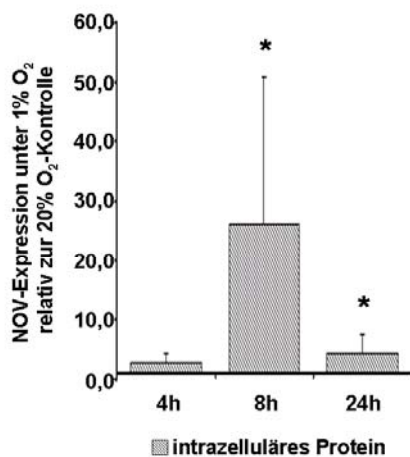
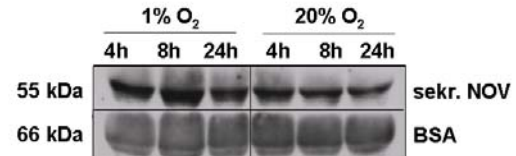
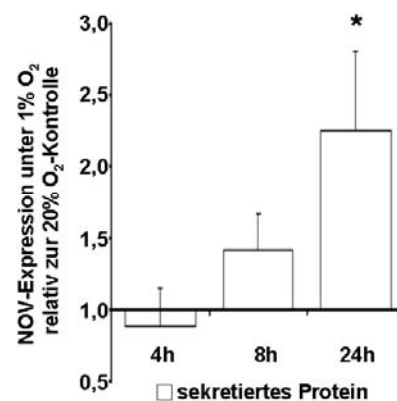
A**B****C**

Abb. 3.10: Anstieg der NOV-Expression unter hypoxischen Bedingungen. A-C Densitometrische Analyse der NOV-mRNA (A), der intrazellulären (B) und sekretierten (C) Protein-Expression mit Immunblots in JEG3-Zellen gemessen nach 4, 8 und 24 h unter Hypoxie (1% O₂). Die Level der mRNA- und intrazellulären Protein-Expression sind normalisiert zu der β-Aktin Expression, die des sekretierten Proteins zu BSA. Die Werte der mRNA- und Protein-Quantifizierung sind als Mittelwerte der Expression unter 1% O₂ relativ zu 20% O₂ dargestellt, die unter 20% O₂ ermittelten Werte wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zu 20% O₂).

3.1.2.2 Die Regulation von CYR61 und NOV ist von HIF-1α abhängig

Die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV in den humanen plazentaren Explants und den JEG3-Trophoblastzellen konnte nur eine Regulation durch hypoxische Bedingungen

nachweisen. Es stellte sich jedoch die Frage, ob diese Regulation direkt über HIF-1 α erfolgt. Die erhöhten Proteinkonzentrationen von CYR61 und NOV waren zwar von einer Stabilisierung von HIF-1 α auf Proteinebene begleitet, jedoch musste dieses nicht abhängig voneinander reguliert werden. Um eine Regulation über HIF-1 α nachweisen zu können, wurden die JEG3-Zellen zunächst mit dem HIF-1 α -Stabilisator Dimethyloxallylglyzin (DMOG) behandelt. Unter 20% O₂ wird HIF-1 α durch die Prolylhydroxylasen, im Wesentlichen durch PHD2, hydroxyliert und somit für die Degradation gekennzeichnet und abgebaut (s. 1.3). DMOG inhibiert die Prolylhydroxylasen, wodurch das HIF-1 α -Protein auch unter 20% O₂ stabilisiert wird und die hypoxische Situation simuliert werden kann.

3.1.2.2.1 Nachweis der Reaktivität der JEG3-Zellen auf DMOG

Eine Stabilisierung von HIF-1 α durch DMOG war nur durch die Inhibition der PHD2 möglich, daher wurde zunächst die Expression der PHD2-Transkripte in einer kompetitiven semi-quantitativen PCR mit β -Aktin nach 4, 8 und 24 h unter 20% O₂ und Hypoxie (1% O₂) nachgewiesen (Abb. 3.11 A). Wie in der Abb. 3.11 A zu erkennen ist, werden die PHD2-Transkripte über die gesamte Versuchsspanne exprimiert. Zum Nachweis der HIF-1 α -Stabilisierung wurden die JEG3-Zellen mit 1 mM DMOG für jeweils 4, 8 und 24 h unter 20% O₂ inkubiert. Als Kontrolle diente die Kultivierung der JEG3-Zellen mit dem Lösungsmittel PBS als Zusatz. Wie in Abb. 3.11 B zu sehen ist, konnte das HIF-1 α -Protein bereits nach 4 h durch DMOG stabilisiert werden und blieb über die gesamte Versuchsspanne von 24 h stabil exprimiert.

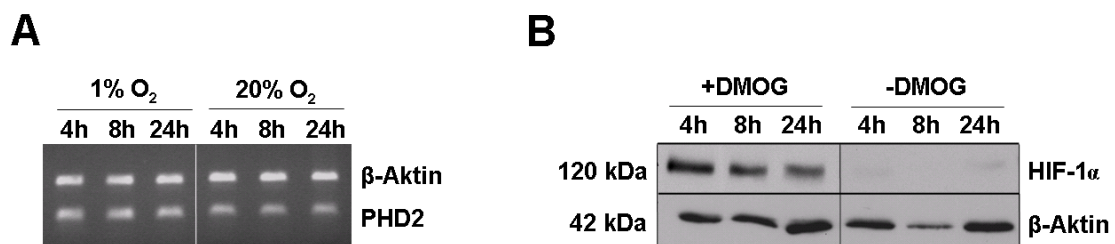


Abb. 3.11: Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins mit Hilfe des PHD2-Inhibitors DMOG. A, Semi-quantitative PCR von PHD2 und β -Aktin in JEG3-Zellen inkubiert unter Hypoxie (1% O₂) und 20% O₂ für 4, 8 und 24 h. B, Exemplarischer Immunblot der HIF-1 α -Stabilisierung in JEG3-Zellen durch DMOG über eine Zeitspanne von 24 h unter 20% O₂. Als Kontrolle diente die Verwendung des Lösungsmittels PBS ohne DMOG (-DMOG).

3.1.2.2.2 Bestimmung der CYR61- und NOV-Expression unter dem Einfluss von DMOG

Die JEG3-Zellen wurden entweder mit 1 mM DMOG oder nur mit dem Lösungsmittel für jeweils 4, 8 und 24 h unter 20% O₂ inkubiert und anschließend die mRNA- und Protein-Expression mittels quantitativer Real-time PCR- und Western Blot-Analyse bestimmt. Die Expression der CYR61- und NOV-mRNA und des intrazellulären Proteins wurde zu β -Aktin, die des sekretierten Proteins zu BSA normalisiert. Anschließend wurde die Expression der mit DMOG behandelten Zellen zu der Expression der mit dem Lösungsmittel behandelten Zellen normalisiert. Die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins führte zu einer ansteigenden CYR61-mRNA-Expression mit signifikanter 5,7-facher Hochregulation nach 24 h unter DMOG-Einfluss (Abb. 3.12 A). Interessanterweise konnte auf intrazellulärer Proteinebene bereits nach 4 h unter DMOG-Einfluss eine signifikante 17-fache Hochregulation von CYR61 nachgewiesen werden, welche nach 8 h herunterreguliert war und nach 24 h wiederum signifikant anstieg (Abb. 3.12 B). Im Gegensatz zu der intrazellulären Protein-Expression war das sekretierte CYR61-Protein nach 4 h signifikant herunterreguliert, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg der Expression nach 24 h Inkubationsdauer (Abb. 3.12 C). Die Inkubation der JEG3-Zellen mit DMOG zeigte auf mRNA-Ebene einen kontinuierlichen Anstieg der NOV-Transkripte, beginnend nach 8 h unter DMOG-Einfluss. Während die NOV-mRNA nach 4-stündiger Inkubation zunächst leicht herunterreguliert war, stieg diese nach 8 h signifikant an und erreichte nach 24 h eine signifikante 3,3-fache Hochregulation (Abb. 3.13 A). Die Induktion des intrazellulären NOV-Proteins durch DMOG erfolgte bereits nach 4 h, gefolgt von einer Herunterregulation und einem erneuten, jedoch signifikanten Anstieg der Expression nach 24 h (Abb. 3.13 B). Die Sekretion von NOV war über die gesamte Versuchsspanne erhöht mit einem Peak nach 8 h unter DMOG-Einfluss und einem leichten Abfall nach 24 h (Abb. 3.13 C), jedoch konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Zusammenfassend, zeigt die Kultivierung der JEG3-Zellen mit DMOG eine ähnliche Hochregulation der mRNA- und der intrazellulären Proteinexpression wie unter hypoxischen Bedingungen. Die sekretierten Proteinlevel zeigen jedoch ein anderes Expressionsmuster. Die Sekretion unter Hypoxie war sowohl bei CYR61 als auch bei NOV signifikant hochreguliert im Gegensatz zu der Kultivierung unter DMOG-Einfluss, bei der keine signifikante Hochregulation nachgewiesen werden konnte.

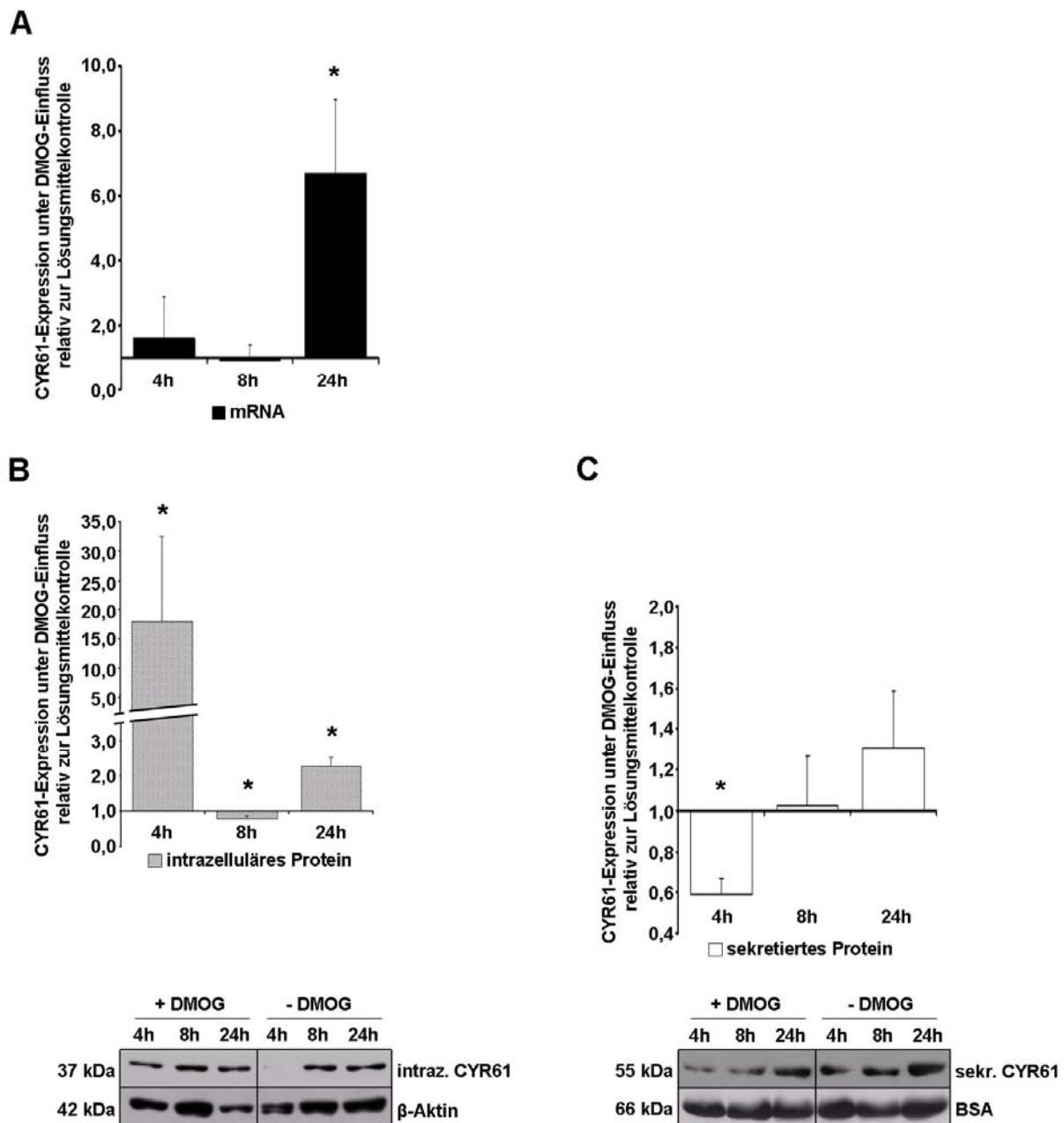


Abb. 3.12: Die CYR61-Expression wird durch die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins reguliert. A-C, Densitometrische Analyse der CYR61-mRNA (A), der intrazellulären (B) und sekretierten (C) Protein-Expression mit den zugehörigen Immunblots in JEG3-Zellen nach DMOG-Behandlung für 4, 8 und 24 h unter 20% O₂. Die intrazelluläre CYR61-Protein-Expression ist zu der β -Aktin Expression normalisiert, die des sekretierten Proteins zu BSA. Die quantifizierten mRNA- und Protein-Werte sind als Mittelwerte der Expressionslevel unter Einfluss von DMOG relativ zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Expressionslevel der mit dem Lösungsmittel behandelten Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (-DMOG)).

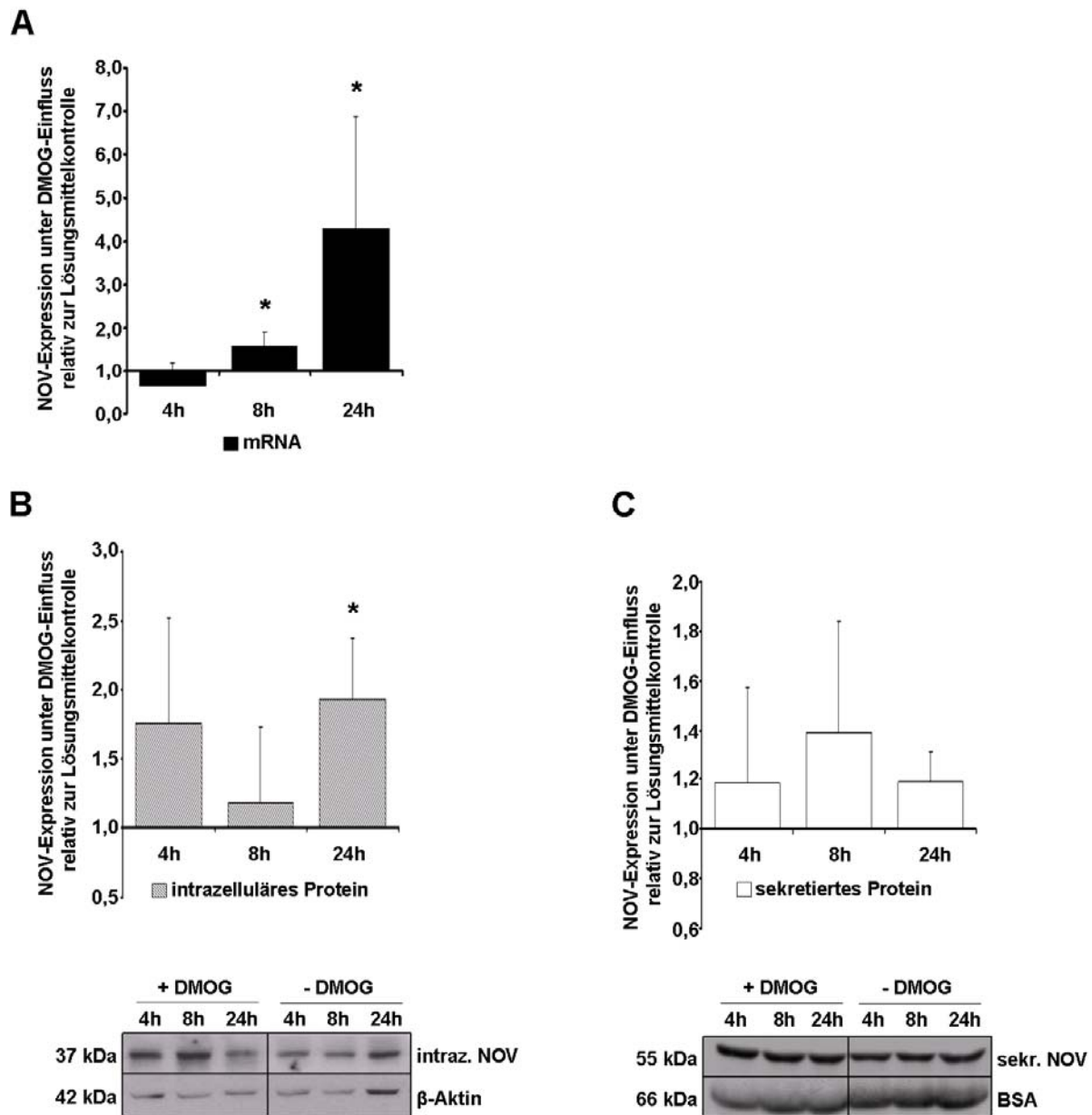


Abb. 3.13: Die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins durch DMOG induziert die Hochregulation von NOV. A-C, Densitometrische Analyse der NOV-mRNA (A), der intrazellulären (B) und sekretierten (C) Protein-Expression mit den zugehörigen Immunblots in JEG3-Zellen nach DMOG-Behandlung für 4, 8 und 24 h unter 20% O₂. Die Höhe der intrazellulären Protein-Expression ist zu der β -Aktin-Expression normalisiert, die des sekretierten Proteins zu BSA. Die quantifizierten mRNA- und Protein-Werte sind als Mittelwerte der Expressionslevel unter Einfluss von DMOG relativ zu der Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Expressionslevel der Kontrollen wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (-DMOG)).

3.1.2.3 Die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV erfolgt über HIF-1 α

Die vorhergehenden Ergebnisse konnten den Nachweis erbringen, dass CYR61 und NOV durch Hypoxie reguliert werden und dass sie durch die Verwendung von DMOG, welches HIF-1 α unter 20% O₂ stabilisiert, eine ähnliche Regulation von CYR61 und NOV zeigen wie unter Hypoxie. Die Auswirkungen von DMOG auf die Zellen und insbesondere auf Proteine, welche durch Hypoxie reguliert werden, sind jedoch noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Chemikalie noch andere Proteine beeinflusst, welche eine Regulation der zu untersuchenden Gene herbeiführen könnten. Es ist bekannt, dass DMOG neben den Prolylhydroxylasen auch die Asparaginyl-Hydroxylasen (Jaakkola et al., 2001; Epstein et al., 2001; Lando et al., 2002; Hewitson et al., 2002) und die Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase (Baader et al., 1994) inhibieren kann. Zudem ist es vorr. fähig andere Mitglieder der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen zu inhibieren (Elvidge et al., 2006). Eine direkte Regulation von CYR61 und NOV durch HIF-1 α wurde daher mit Hilfe von siRNA-Experimenten gezielt auf HIF-1 α in JEG3-Zellen durchgeführt.

3.1.2.3.1 Ermittlung der Transfektionseffizienz von siRNAs in JEG3-Zellen

Bevor die JEG3-Zellen mit siRNAs gegen HIF-1 α und einer internen Kontrolle transfiziert werden konnten, musste die Transfektionseffizienz der Zelllinie getestet werden. Dazu wurden die JEG3-Zellen mit dem Fluorescein-markierten dsRNA Oligomer BLOCK-iT transfiziert und die Transfektionseffizienz anhand der Menge der fluoreszierenden Zellen bestimmt. Zunächst wurden die JEG3-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des BLOCK-iT Oligomers und unterschiedlichen Transfektionsreagenzien transfiziert und die Transfektionseffizienz nach 24 h oder 48 h ermittelt. Eine optimale Transfektionseffizienz konnte bei der Verwendung des Transfektionsreagenz INTERFERin nach 24 h Inkubation festgestellt werden; die optimale Menge an siRNA betrug 20 nm und das Verdünnungsverhältnis des Transfektionsreagenz 1:50. Die Transfektionseffizienz betrug bei Verwendung der genannten Konzentrationen zwischen 80 und 90%.

3.1.2.3.2 Nachweis der Effizienz des HIF-1 α Silencing

Nach der Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen wurden die JEG3-Zellen entweder transient mit HIF-1 α -siRNA oder der nicht-bindenden siRNA siCONTROL als eine

interne Kontrolle transfiziert und für 24 h unter 20% O₂ mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der transfizierten Zellen unter hypoxischen (1% O₂; siHIF-1 α und siCONTROL) Bedingungen oder unter 20% O₂ (siCONTROL) für jeweils 4, 8 und 24 h. Nach der Inkubation der Zellen wurde zunächst bei jedem Versuchsdurchlauf die Effizienz des HIF-1 α -Silencing mit Hilfe eines Immunblots mit Antikörpern gegen HIF-1 α bestimmt. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Der spezifische Knock-down der HIF-1 α Proteine lag zwischen 80 und 90% in allen Experimenten, ein Beispielblot ist in Abb. 3.14 dargestellt.

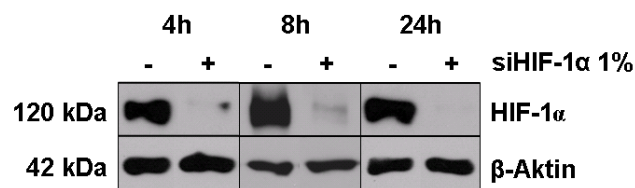


Abb. 3.14: Silencing von HIF-1 α in JEG3-Zellen mit Hilfe von siRNAs. A, Immunblot der HIF-1 α Protein-Expression. Es ist eine signifikante Reduktion des HIF-1 α -Proteins durch Behandlung der JEG3-Zellen HIF-1 α -siRNA zu erkennen. Die Zellen wurden entweder mit HIF-1 α -siRNA (+) oder siCONTROL (-), eine als Kontrolle dienende, nicht bindende siRNA, unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Die Effizienz des HIF-1 α -Silencing lag in drei unabhängigen Experimenten zwischen 80 und 90%.

3.1.2.3.2 Ermittlung der CYR61 und NOV Expression unter dem Einfluss von siRNAs gegen HIF-1 α

Nach der Inkubation der Zellen für 4, 8 und 24 h unter Hypoxie oder 20% O₂ wurden die Gesamt-RNA und die intrazellulären Proteine isoliert und der Zellkulturüberstand für die Analyse der sekretierten Proteine verwendet. Die Expression der mRNA und der intrazellulären Proteine wurde mit β -Aktin, die der sekretierten Proteine mit BSA, normalisiert. Für die Berechnung des Einflusses der HIF-1 α -siRNA auf die CYR61- und NOV-Expression wurden die Expressionswerte der mit siCONTROL und siHIF-1 α behandelten und unter Hypoxie kultivierten Zellen zu denen mit siCONTROL behandelten und unter 20% O₂ kultivierten Zellen normalisiert. Die Expression der unter siCONTROL und 20% O₂ kultivierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Die Herunterregulation von HIF-1 α unter Hypoxie zeigte keine Unterschiede in der mRNA-Expression von CYR61 (Abb. 3.15 A), führte jedoch zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären CYR61-Protein-Expression nach 24 h (Abb. 3.15 B). Im Gegensatz dazu war die Sekretion von CYR61 nach 24-stündiger Inkubation signifikant hochreguliert (Abb. 3.15 C). Der Knock-down von HIF-1 α ergab eine

signifikante Herunterregulation der NOV-mRNA nach 8 h unter Hypoxie (Abb. 3.16 A) und führte auch zu einer reduzierten intrazellulären NOV-Proteinmenge nach 4 und 24 h Inkubation (Abb. 3.16 B), wobei die NOV-Sekretion bei verminderter HIF-1 α -Expression über den gesamten Versuchszeitraum nahezu unverändert war (Abb. 3.16 C).

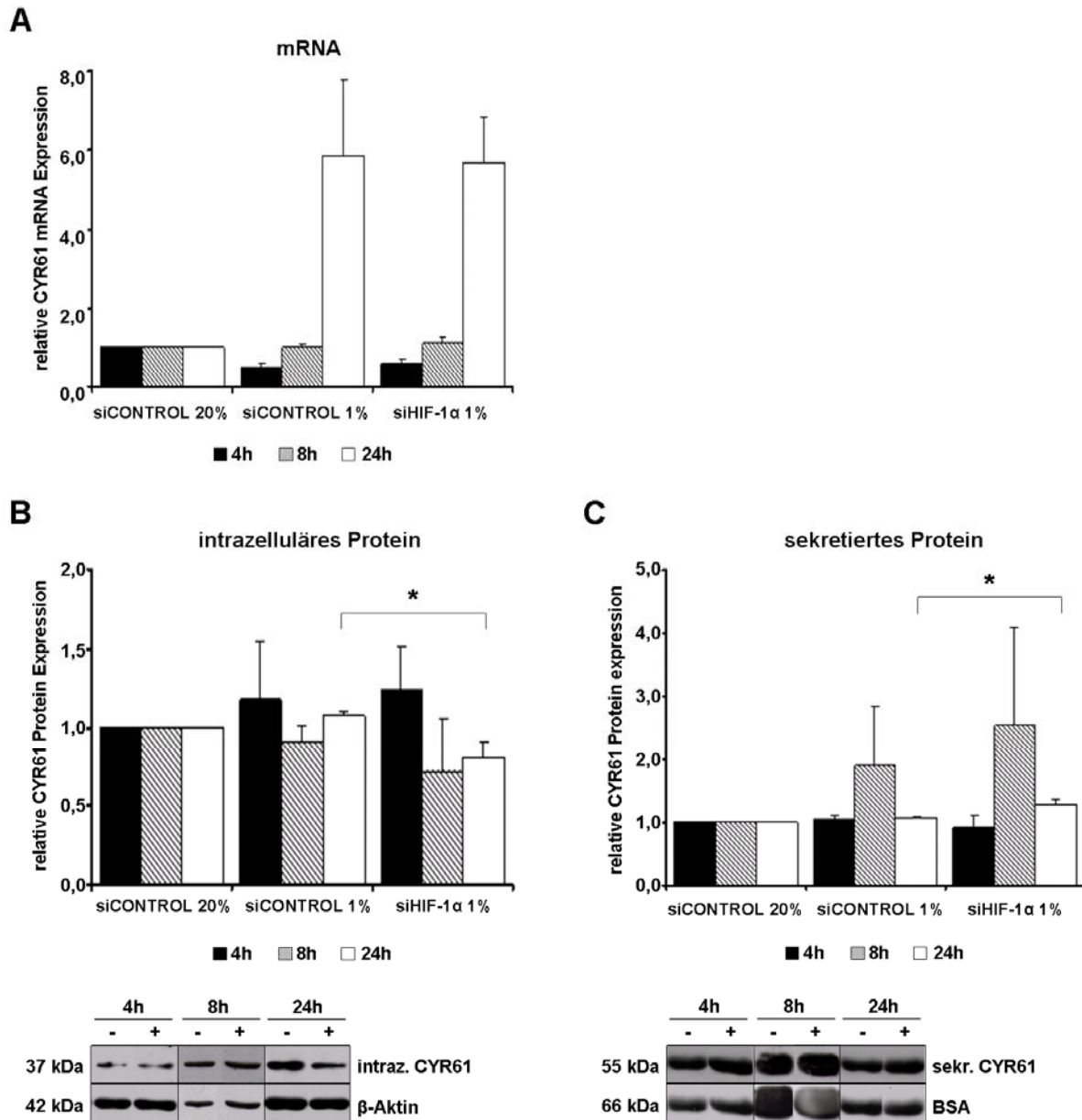


Abb. 3.15: HIF-1 α -abhängige Regulation der CYR61-Expression in JEG3-Zellen. A-C, Densitometrische Analyse der CYR61 mRNA (A), des intrazellulären (B) und sekretierten Proteins (C) nach Behandlung der JEG3-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α (+) oder siCONTROL (-) unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) oder siCONTROL unter 20% O₂ für 4, 8 und 24 h. Die zugehörigen Western Blots sind unter den Graphiken aufgeführt. Die Expressionswerte sind Mittelwerte normalisiert zu β -Aktin (mRNA, intrazelluläres Protein) oder BSA (sekretiertes Protein). Die Expressionslevel der mit siCONTROL unter 20% O₂ behandelten Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zu siCONTROL unter Hypoxie (-)).

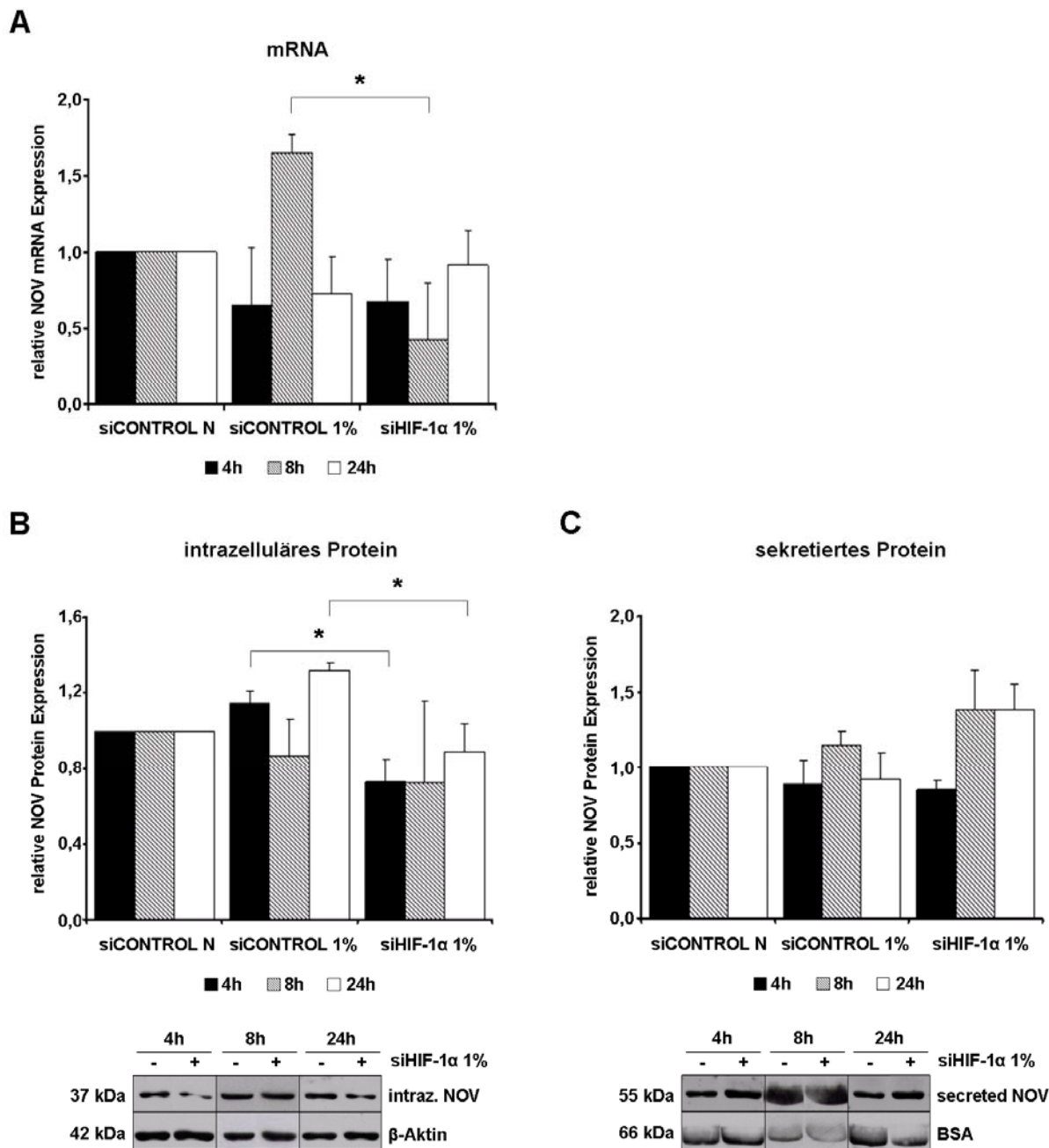


Abb. 3.16: HIF-1 α -abhängige Regulation der NOV-Expression in JEG3-Zellen. A-C, Densitometrische Analyse der NOV-mRNA (A), des intrazellulären (B) und sekretierten Proteins (C) nach Behandlung der JEG3-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α (+) oder siCONTROL (-) unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) oder siCONTROL unter 20% O₂ für 4, 8 und 24 h. Die zugehörigen Western Blots sind unter den Graphiken aufgeführt. Die Expressionswerte sind Mittelwerte normalisiert zu β -Aktin (mRNA, intrazelluläres Protein) oder BSA (sekretiertes Protein). Die Expressionslevel der mit siCONTROL unter 20% O₂ behandelten Zellen wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zu siCONTROL unter Hypoxie (-)).

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das intrazelluläre CYR61- und NOV-Protein direkt über HIF-1 α reguliert wird, da eine Hochregulation sowohl unter Hypoxie, als auch unter DMOG-Einfluss nachgewiesen werden konnte und beide Proteine bei signifikant verringerter HIF-1 α -Expression durch Verwendung von siRNAs ebenfalls signifikant herunterreguliert waren. Während die sekretierte Form von CYR61 durch Einfluss von DMOG nur leicht hochreguliert wurde, war bei verringerter HIF-1 α -Expression keine Herunterregulation zu beobachten. Dieses deutet darauf hin, dass die Sekretion von CYR61 zwar Hypoxie abhängig, jedoch HIF-1 α -unabhängig ist. Die gleichen Ergebnisse konnten für NOV beobachtet werden. Die Sekretion nach Inkubation der Zellen mit DMOG war ebenso nur geringfügig verändert wie bei CYR61, jedoch konnte auch keine Herunterregulation bei verringerter HIF-1 α -Expression gezeigt werden.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine durch HIF-1 α in JEG3-Zellen reguliert werden, im Vergleich zu der HIF-1 α -unabhängigen Regulation der sekretierten Formen.

3.1.2.4 TGF- β 3 ist in die CYR61- and NOV-Regulation unter Hypoxie involviert

Die Ergebnisse des vorhergehenden Versuchs mit siRNA gegen HIF-1 α deuten darauf hin, dass es einen zusätzlichen Signalweg zu HIF-1 α unter Hypoxie geben muss, der u.a. die Sekretion von CYR61 und NOV unter hypoxischen Bedingungen beeinflussen kann. Da TGF- β 3 als wichtiger Faktor bei der Trophoblastinvasion bekannt ist (Caniggia et al., 1999, 2000a, 2000b; Nishi et al., 2004) und unter Hypoxie reguliert wird (Caniggia et al., 2000b), wurde in der vorliegenden Arbeit die CYR61- und NOV-Expression unter dem Einfluss von TGF- β 3 unter Hypoxie (1% O₂) untersucht. Zunächst wurde die TGF- β 3-Expression unter Hypoxie bestimmt. Wie in Abb. 3.17 dargestellt ist, konnte eine gesteigerte Protein-Expression von TGF- β 3 durch Hypoxie induziert werden. Die TGF- β 3-Expression stieg langsam nach 4 h unter Hypoxie an und erreichte eine maximale signifikante Hochregulation nach 8 h, welche anschließend wieder abfiel, jedoch signifikant erhöht blieb. Die Expression unter Hypoxie wurde zu der Expression unter 20% O₂ abgeglichen und die unter 20% O₂ ermittelten Expressionswerte auf 1 gesetzt. Die Hochregulation der Expression ging gleichzeitig mit der Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins einher.

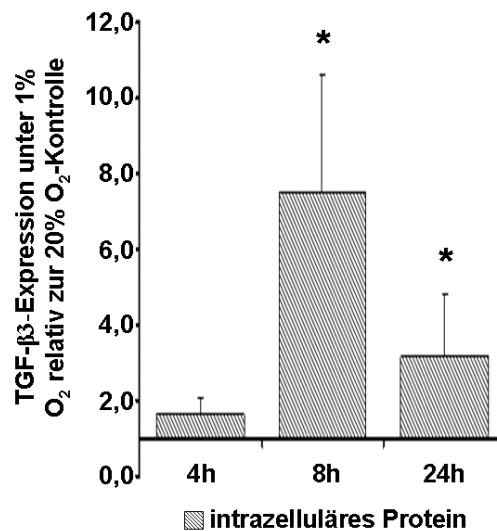


Abb. 3.17: Anstieg der TGF-β3-Expression unter Einfluss von Hypoxie. A, Densitometrische Auswertung der TGF-β3-Protein-Expression unter Hypoxie (1% O₂) für 4, 8 und 24 h. Die Expression unter Hypoxie wurde zu der Expression unter 20% O₂ abgeglichen und die unter 20% O₂ ermittelten Expressionswerte auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0,05$ (gemessen im Vergleich zu 20% O₂).

3.1.2.4.1 Analyse der CYR61- und NOV-Regulation durch den Einfluss von rekombinantem TGF-β3 unter Hypoxie

Damit die Regulation von CYR61 und NOV unter Einfluss von TGF-β3 untersucht werden konnte, wurde als Erstes die Reaktivität der JEG3-Zellen auf das rekombinante TGF-β3 überprüft. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem TGF-β3 inkubiert (10, 20, 50 und 100 ng rekombinantes TGF-β3) und anschließend unter hypoxischen Bedingungen für jeweils 4, 8 und 24 h weiter kultiviert. Als Kontrolle diente die Inkubation von JEG3-Zellen mit dem Lösungsmittel unter Hypoxie für 4, 8 und 24 h. Eine Induktion der CYR61- und NOV-Expression konnte erst mit einer Konzentration von 100 ng des rekombinanten Proteins erreicht werden. Daher wurden die folgenden Untersuchungen zu der Regulation der CYR61- und NOV-Expression mit 100 ng des rekombinanten Proteins fortgesetzt. Zur Ermittlung der Beteiligung von TGF-β3 an der hypoxischen Regulation, wurde das intrazelluläre Protein aus dem Zelllysat isoliert und der Zellkulturüberstand zum Nachweis der sekretierten Protein-Expression verwendet. Der Abgleich der Expressionswerte von CYR61 und NOV erfolgte wie in 3.1.2.3 beschrieben mit β-Aktin und BSA, die Expression von CYR61 und NOV wurde zu der Expression unter Hypoxie ohne zusätzliche Gabe von rekombinantem TGF-β3 normalisiert. Die Expression der Kontrolle wurde dabei

auf 1 gesetzt. Dadurch konnte eine Steigerung oder Abnahme der CCN-Proteinlevel, induziert durch rekombinantes TGF- β 3, unter Hypoxie nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigen die beiden CYR61- und NOV-Proteine ein komplett gegensätzliches Expressionsmuster bzgl. des intrazellulären im Vergleich zum sekretierten Protein nach 4- und 24-stündiger Kultivierung unter TGF- β 3-Einfluss. Während die Menge an intrazellulärem CYR61 nur nach 4 h unter Hypoxie und TGF- β 3-Einfluss als “early response” signifikant anstieg (Abb. 3.18 A), verringerte sich die Menge an intrazellulärem NOV-Protein nach 4 h. Die intrazelluläre NOV-Expression stieg zudem nach verlängerter Hypoxie (24 h) signifikant an (Abb. 3.19 A). Im Vergleich zum sekretierten NOV, welches nur leicht durch die TGF- β 3-Kultivierung unter Hypoxie moduliert war (Abb. 3.19 B), war die CYR61-Sekretion nach 4 h herunterreguliert und stieg nach 8 h signifikant an mit einem nochmaligen Anstieg nach 24 h (Abb. 3.18 B).

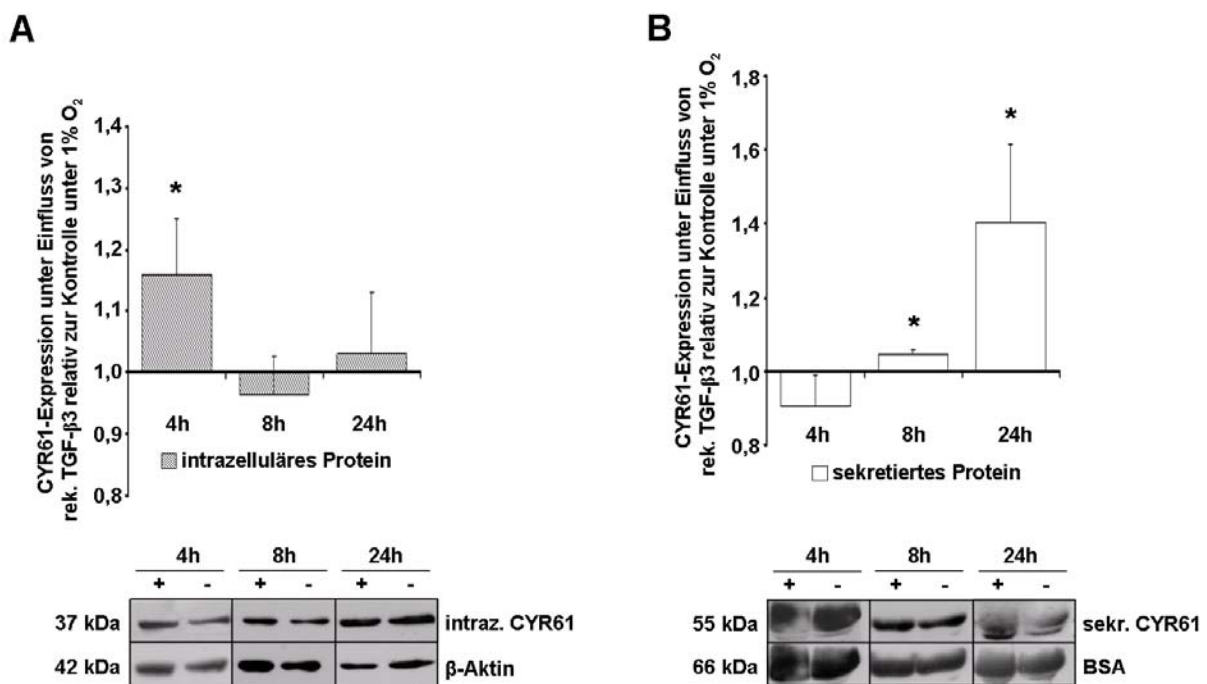


Abb. 3.18: Einfluss von TGF- β 3 auf die hypoxische Regulation von CYR61 in JEG3-Zellen. A, B, Immunblots und densitometrische Auswertung des intrazellulären (A) und sekretierten (B) CYR61-Proteins nach Behandlung mit 100 ng rekombinantem TGF- β 3 unter Hypoxie für 4, 8 und 24 h. Die intrazelluläre Protein-Expression ist zu der Expression von β -Aktin, die des sekretierten Proteins zu BSA normalisiert. Die quantifizierten Werte stellen die Mittelwerte der Expressionslevel unter dem Einfluss von rekombinantem TGF- β 3 (+) unter Hypoxie (1% O₂) relativ zu den Lösungsmittelkontrollen (-) unter Hypoxie dar. Die Expressionslevel der Lösungsmittelkontrolle unter Hypoxie wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle unter Hypoxie (-)).

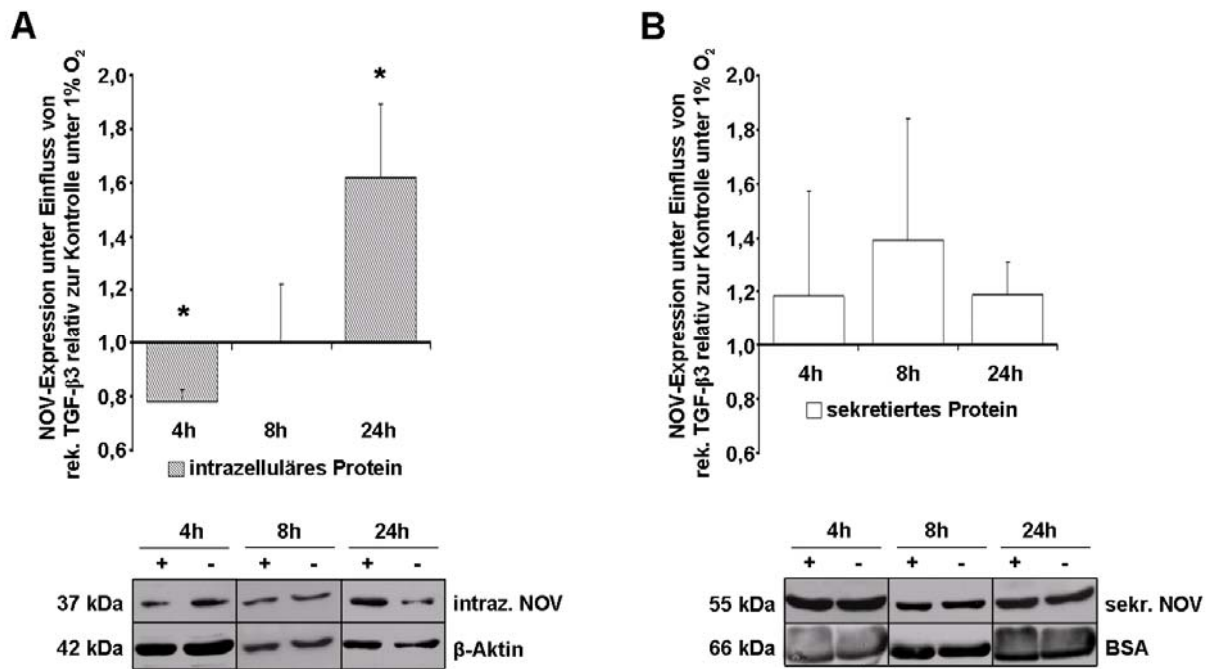


Abb. 3.19: Beteiligung von TGF-β3 an der hypoxischen Regulation von NOV in JEG3-Zellen. A, B, Immunblots und densitometrische Auswertung des intrazellulären (A) und sekretierten (B) NOV-Proteins nach Behandlung mit 100 ng rekombinantem TGF-β3 unter Hypoxie für 4, 8 und 24 h. Die intrazelluläre Protein-Expression ist zu der Expression von β-Aktin, die des sekretierten Proteins zu BSA normalisiert. Die quantifizierten Werte stellen die Mittelwerte der Expressionslevel unter dem Einfluss von rekombinantem TGF-β3 (+) unter Hypoxie (1% O₂) relativ zu den Lösungsmittelkontrollen (-) unter Hypoxie dar. Die Expressionslevel der Lösungsmittelkontrolle unter Hypoxie wurden dabei auf 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Quantifizierungen und die Balken den Standardfehler des Mittelwertes. *, $P < 0.05$ (gemessen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle unter Hypoxie (-)).

Die zusätzliche Gabe von TGF-β3 modulierte die Expression der beiden CCN-Proteine unterschiedlich. Es konnte eine Regulation der intrazellulären CCN-Proteine und der CYR61-Sekretion, nicht jedoch der NOV-Sekretion, durch TGF-β3 unter Hypoxie nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen mit Hypoxie, DMOG, HIF-1α siRNA und rekombinanten TGF-β3, dass die intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine durch HIF-1α und TGF-β3 unter Hypoxie in JEG3-Zellen reguliert zu sein scheinen, im Vergleich zu den sekretierten CCN-Proteinen. Die Ergebnisse deuten zudem auf eine HIF-1α-unabhängige Regulation des CYR61-Sekretionsprozesses durch TGF-β3 und Hypoxie hin.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die hypoxische Regulation der CCN-Proteine CYR61 und NOV im humanen invasiven Trophoblasten untersucht. Bisherige Versuche der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager zeigten, im Hinblick auf die Regulation von CYR61 und NOV in der Plazenta, eine starke Expression von CYR61 und NOV in den extravillösen invasiven Trophoblast-Riesenzellen von normalen Plazenten. Zudem konnte eine Expression der beiden Moleküle in Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems nachgewiesen werden (Gellhaus et al. 2006). Dagegen zeigten Plazenten von Patientinnen mit einer schweren, frühzeitig beginnenden, Präeklampsie eine verringerte Expression von CYR61 und NOV im Vergleich zu Plazenten des gleichen Gestationsalters gesunder Patientinnen (Gellhaus et al., 2006, 2007). Ferner konnten Hinweise für reduzierte Konzentrationen der beiden Proteine im Serum von Schwangeren, die an einer Präeklampsie erkrankt waren, gefunden werden (Gellhaus et al., 2007).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winterhager zeigten, dass CYR61 in der Pathogenese der Endometriose involviert ist (Absenger et al., 2004; Groothuis et al., 2005) und ein Anstieg von CYR61 mit einer gesteigerten Angiogenese in ektopischen endometrialen Läsionen in Pavianen verbunden zu sein scheint (Gashaw et al., 2006). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Patrick Groothuis, Maastricht, konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass CYR61 das am meisten hochregulierte Gen, verglichen mit anderen angiogenetischen Faktoren, im Endometrium ist. Zudem ist bekannt, dass CYR61, welches durch Östrogen in verschiedenen Organen reguliert wird, durch Sauerstoff reguliert werden kann (Kunz et al., 2003).

Damit der Embryo ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann, ist es notwendig, dass die embryonalen Trophoblastzellen in die Dezidua einwandern, um Zugang zu den maternalen Gefäßen zu erlangen (Fisher, 2004). Diese Trophoblastinvasion beginnt in dem ersten Trimester der Schwangerschaft zwischen der 6. und 9. SSW. Zu diesem Zeitpunkt herrscht ein hypoxisches Milieu von ca. 3% O₂ innerhalb der sich bildenden Plazenta (Jauniaux et al., 2000), welches Voraussetzung für die Invasionsfähigkeit des Trophoblasten ist (Genbacev et al., 1996, 1997; Jauniaux et al., 2006). Diese Trophoblastinvasion ist in der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie gestört (McMaster et al., 2004; Fisher, 2004), welches eine Unterversorgung des Embryos zur Folge hat.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation und Regulation der Migrationsfaktoren CYR61 und NOV in dem humanen plazentaren Explant-Modell des ersten Trimesters und in der invasiven malignen Trophoblast-Zelllinie JEG3 unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen untersucht.

4.1 CYR61 und NOV werden in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters durch die Sauerstoffkonzentration reguliert und sind möglicherweise an der Trophoblastinvasion beteiligt.

4.1.1 Anstieg der CYR61- und NOV-Expression in plazentaren Explants des ersten Trimesters

Die Beteiligung der beiden CCN-Proteine an der Trophoblastinvasion wurde zunächst durch die Bestimmung der Lokalisation von CYR61 und NOV in den plazentaren Explants durch Detektion der beiden Proteine mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Die für eine Woche unter niedrigem Sauerstoffgehalt (3% O₂) kultivierten plazentaren Explants zeigten eine Ko-Lokalisation der beiden CCN-Proteine mit dem Trophoblastzell-Marker Zytokeratin 7. Die Doppelfärbung konnte zeigen, dass CYR61 und NOV in den äußeren Schichten des plazentaren Explants, dem Zytotrophoblasten und dem Synzytiotrophoblasten, lokalisiert waren. Dieses weist darauf hin, dass sowohl CYR61 als auch NOV an der Trophoblastinvasion beteiligt sein könnten, da diese an der Invasionsfront des plazentaren Explants exprimiert wurden. Die genauere Untersuchung der Invasionsfront durch eine Doppelfärbung der plazentaren Explants und der invadierten Trophoblastzellen mit CYR61 oder NOV und HLA-G konnte zeigen, dass beide CCN-Proteine mit dem EVT-Marker-Protein HLA-G (Kovats et al., 1990) ko-lokalisiert waren. Die Doppelfärbung von CYR61 und HLA-G konnte nicht nur allein in den EVT-Zellen der Zellsäulen, sondern auch in Zellen, die in das Matrigel invadiert waren, nachgewiesen werden. Die NOV- und HLA-G-positiven Trophoblastzellen befanden sich meistens am Rand der Zellsäule und in bereits in das Matrigel invadierten EVT-Zellen.

Die Arbeitsgruppe um Rimón et al. konnte eine ähnliche Lokalisation für CTGF, ein anderes Mitglied der CCN-Familie, welches die Migration in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Brustkrebszellen, Chondrozyten und Endothelzellen, reguliert (Shimo et al., 1999; Babic et

al., 1999; Luo et al., 2006; Chen PS et al., 2007; Pandey et al., 2009; Tan et al., 2009), in der reifen Plazenta nachweisen. Sie detektierten CTGF zum Einen in Biopsien von humanen Plazenten des dritten Trimesters, welche nach der Geburt entnommen wurden, und zum Anderen in kultivierten primären Zytotrophoblastzellen desselben Gestationsalters. Die Expression von CTGF war in den Biopsien hauptsächlich in der Trophoblast-Doppelschicht, welche die plazentaren Zotten umgibt, und in den Endothelzellen des Plazentagewebes lokalisiert. In den kultivierten primären Trophoblastzellen war CTGF in den mononukleären Zytotrophoblastzellen und im Synzytium exprimiert (Rimon et al., 2008).

Die für die Inkubation der plazentaren Explants gewählte niedrige Sauerstoffkonzentration von 3% O₂ entspricht dem physiologischen Sauerstoffgehalt in der Plazenta des ersten Trimesters (Jauniaux et al., 2000). Es konnte festgestellt werden, dass nur unter diesen Kulturbedingungen eine Invasion der Trophoblastzellen zu beobachten war, im Gegensatz zur Kultivierung unter 20% O₂. Diese Erkenntnis konnte durch Studien von Caniggia et al. (2000b) bestätigt werden. Diese Arbeitsgruppe inkubierte plazentare Explants des ersten Trimesters ebenfalls unter 3% O₂ und 20% O₂. Sie fanden heraus, dass bei dem Sauerstoffgehalt von 20% O₂ nur eine minimale Anzahl an EVT-Zellen, ausgehend von den Enden der Zotten, in das Matrigel invadierten, wogegen die Inkubation der Explants unter niedrigen Sauerstoffbedingungen eine starke Invasion der EVT-Zellen zeigte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Invasion der EVT-Zellen durch den niedrigen Sauerstoffgehalt in ihrer Umgebung stimuliert wird, welches durch Studien anderer Arbeitsgruppen ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Genbacev et al., 1996, 1997; Jauniaux et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der CYR61- und NOV-Expression durch eine verminderte Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung der plazentaren Explants des ersten Trimesters nachgewiesen werden. Es konnte eine Hochregulation beider Transkripte und Proteine unter dem physiologischen geringen Sauerstoffgehalt in der Plazenta des ersten Trimesters von 3% O₂ (Jauniaux et al., 2000) im Vergleich zu dem physiologischen Sauerstoffgehalt in der reifen Plazenta (8% O₂) (Fujikura und Yoshida, 1996; Schaaps et al., 2005) oder unter Standard-Kulturbedingungen von 20% O₂ detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit der starken Expression in den invasiven EVT-Zellen unter Sauerstoffmangel und weisen auf eine mögliche Rolle bei der Invasion der Zellen hin. Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde stimmen mit einer jüngsten Studie von McCaig und Lyall überein, in der gezeigt wurde, dass eine akute Hypoxie die Expression von GCM1 in plazentaren Explants hochreguliert (McCaig und Lyall, 2009).

GCM1 ist ein für die plazentare Entwicklung wichtiger Transkriptionsfaktor. Die Deletion von GCM1 führt in Mäusen zu einer kompletten Blockierung des Einwachsens des allantoischen Mesenchyms in die uteroplazentare Anlage, wobei die Mäuse an Tag E10 auf Grund des nicht vorhandenen plazentaren Labyrinths sterben. Zusätzlich formen die embryonalen GCM1-defizienten Trophoblastzellen keinen Synzytiotrophoblasten aus (Anson-Cartwright et al., 2000; Schreiber et al., 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das plazentare GCM1 und sein Target-Gen Syncytin in der Präeklampsie unter chronischer Hypoxie herunterreguliert sind (Chen CP et al., 2004), welches sich mit den Ergebnissen von Gellhaus et al. (2007) deckt. In dieser Studie waren CYR61 und NOV in Seren und Plazenten von präeklampsischen Patientinnen ebenfalls herunterreguliert.

4.2 CYR61 und NOV werden durch Hypoxie in der Trophoblast-Zelllinie JEG3 reguliert

4.2.1 Hypoxie bewirkt eine Lokalisationsänderung von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass die Zellen der malignen Chorionkarzinomzelllinie JEG3 CCN-Proteine exprimieren. Diese humane Trophoblast-Zelllinie gilt auf Grund ihrer Migrations- und Invasionsfähigkeit (Grümmer et al., 1994, 1999; Zhou et al., 1997a) als ein geeignetes Modell für den invasiven EVT und wurde deswegen ausgewählt, um die Regulation von CYR61 und NOV unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen zu untersuchen. Die unter 1% O₂ oder 20% O₂ kultivierten JEG3-Zellen zeigten eine intrazelluläre Lokalisationsänderung von CYR61 und NOV nach 8-stündiger Inkubation unter Hypoxie. NOV wies unter 20% O₂ eine starke Expression im Nukleus auf mit einer geringeren Verteilung im Zytoplasma, wobei die Inkubation unter Hypoxie eine Lokalisationsänderung des Proteins in Richtung der Nukleusmembran bewirkte. Innerhalb des Nukleus war nur noch eine geringe bis nicht erkennbare Expression zu beobachten. Die Lokalisationsänderung bei dem CYR61-Protein war dagegen weniger deutlich im Vergleich zum NOV-Protein. Unter 20% O₂ war CYR61 zunächst stark im Nukleus und nur geringfügig im Zytoplasma exprimiert. Die Inkubation der Zellen unter Hypoxie bewirkte eine stärkere Lokalisation an der Nukleusmembran, jedoch war CYR61 auch noch im Nukleus und geringfügig im Zytoplasma exprimiert.

Interessanterweise zeigten die unter Hypoxie kultivierten Trophoblastzellen eine ähnliche Lokalisationsänderung von NOV wie JEG3-Zellen, die mit Cx43 transfiziert wurden (Gellhaus et al., 2004). Durch Induktion der Cx43-Expression erfuhr das zuvor im Nukleus lokalisierte NOV-Protein eine Lokalisationsänderung vom Nukleus an die Zellmembran und zeigte dort eine Ko-Lokalisation mit Cx43. Mit NOV transfizierte parentale JEG3-Zellen zeigten ebenfalls eine Lokalisation an der Zellmembran. Beide JEG3-Transfektanten zeigten eine signifikante Reduktion des Zellwachstums. Es wird vermutet, dass Cx43 in der Lage ist, die Wachstumsregulation zu steuern, indem es NOV hochreguliert und an die Zellmembran transloziert. Diese Studie zeigt, dass die Lokalisationsänderung von NOV auf die Beteiligung an weiteren wichtigen zellulären Prozessen, wie z.B. Migration und Invasion, hinweisen könnte. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Änderung des Expressionsmusters könnte daher auf eine Beteiligung des NOV-Proteins an der Regulation der invasiven Trophoblastzellen unter Hypoxie hindeuten. Diese Annahme erfordert jedoch weitere Studien, in denen die Beteiligung von NOV evaluiert werden könnte. Dieses könnte z.B. durch siRNA-Experimente mit einem gerichteten Knock-down von NOV und deren Auswirkung auf die Invasion der Trophoblastzellen unter Hypoxie untersucht werden.

Im Allgemeinen sind CYR61 und NOV sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus exprimiert und können sekretiert werden. Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen Funktionen der CCN-Proteine von ihrer subzellulären Lokalisation und Expression abhängig sind (Perbal, 2001, 2004). Yang und Lau (1991) konnten zum Beispiel zeigen, dass CYR61 mit der EZM assoziiert ist, an die Zelloberfläche gebunden oder als sekretierte und intrazelluläre Form auftreten kann. Außerdem konnte in Tumoren gezeigt werden, dass die trunkierte intrazelluläre Form von NOV die Zellproliferation stimuliert, wogegen die „full length“ Form von NOV sekretiert wird und anti-proliferative Eigenschaften aufweist (Planque und Perbal, 2003). Auf Grund dessen wurde in den gegenwärtigen Experimenten zwischen sekretiertem und intrazellulärem CYR61 und NOV unterschieden.

4.2.2 HIF-1 α und TGF- β 3 beeinflussen die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen

4.2.2.1 Die Expression der intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine wird durch HIF-1 α gesteuert

Mit Hilfe der JEG3-Zelllinie wurde die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV detaillierter analysiert. Die Reaktionsfähigkeit der Zellen auf die niedrige Sauerstoffkonzentration wurde durch den Nachweis der Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins bestimmt, da HIF-1 α durch Hypoxie induziert und stabilisiert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HIF-1 α eine hohe Expression in der Trophoblast-Doppelschicht in der frühen Schwangerschaft zwischen der 5. und 9. SSW aufweist, welches mit dem hypoxischen Milieu in der frühen Plazenta korreliert (Caniggia et al., 2000b). Die Untersuchungen der CYR61-Expression zeigten eine deutliche Hochregulation der mRNA und des intrazellulären CYR61-Proteins nach 8 h unter Hypoxie (1% O₂) im Vergleich zu 20% O₂, gefolgt von einer Herunterregulation nach 24 h. Die mRNA- und intrazelluläre Protein-Expression von NOV zeigte ein vergleichbares Muster zu der CYR61-Expression, wobei NOV eine stärkere signifikante Hochregulation des intrazellulären Proteins nach 8 h unter Hypoxie aufwies. Die Tatsache, dass HIF-1 α über die gesamte Versuchsspanne exprimiert wurde, bestätigte eine anhaltende Hypoxie über die gesamte Laufzeit des Experiments. Obwohl HIF-1 α akkumuliert blieb, fielen die intrazellulären CYR61- und NOV-Proteinlevel in ihrer Expressionsstärke ab, welches auf zusätzliche Signalwege hindeutet, die unter Hypoxie angeschaltet werden könnten und die hypoxische Suppression der beiden CCN-Proteine nach länger anhaltender Hypoxie hervorrufen könnten. Die Ergebnisse, welche aufzeigen, dass nach länger anhaltender Hypoxie eine verminderte Expression von CYR61 und NOV auftritt, korrelieren mit den Ergebnissen von Gellhaus et. al. (2007). In dieser Studie konnte eine Herunterregulation von CYR61 und NOV in Seren von Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu Patientinnen mit einem normalen Verlauf der Schwangerschaft nachgewiesen werden, wobei bekannt ist, dass präeklampsische Plazenten einer länger anhaltenden Hypoxie ausgesetzt sind. Die erzielten Ergebnisse können des Weiteren zum Teil durch andere Publikationen bestätigt werden. Verschiedene Studien konnten eine Regulation von CYR61 unter hypoxischen Bedingungen und HIF-1 α -Einfluss nachweisen. Unsere Arbeitsgruppe konnte in der endometrialen Zelllinie HES eine durch Hypoxie induzierte transiente Hochregulation der CYR61-mRNA und des intrazellulären Proteins nach 2 h unter Hypoxie

(1% O₂) mit einer anschließenden Herunterregulation nachweisen (Gashaw et al., 2008). Die hypoxische Regulation von CYR61 wurde auch in Melanomzellen beobachtet (Kunz et al., 2003). Diese Arbeitsgruppe konnte eine durch c-Jun/AP-1 (ein Komplex aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren) und HIF-1 α (s. 1.3) vermittelte Induktion des CYR61-Promotors in Melanomzellen aufzeigen. Die signifikante Hochregulation der CYR61-Promotor-Aktivität erfolgte jedoch erst nach 16 h unter Hypoxie mit einer weiteren Erhöhung der Aktivität nach 24 h im Vergleich zu 20% O₂ (Kunz et al., 2003).

Da die Hochregulation der CYR61- und NOV-Expression von einer Akkumulation des HIF-1 α -Proteins begleitet war, wurde die Beteiligung von HIF-1 α bei der Hypoxie-stimulierten Erhöhung der mRNA- und Protein-Expression von CYR61 und NOV durch die Inkubation der JEG3-Zellen mit DMOG unter 20% O₂ untersucht. Der Prolylhydroxylasen-Inhibitor DMOG ruft eine Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins unter 20% O₂ hervor, indem es den Abbau von HIF-1 α , welcher durch die initiale Hydroxylierung durch die Prolylhydroxylasen induziert wird, inhibiert (Fandrey et al., 2006). Die Inkubation der JEG3-Zellen mit DMOG führte wie unter Hypoxie zu einer signifikanten Hochregulation der CYR61- und NOV-mRNA. Die Hochregulationen unter DMOG-Einfluss stimmen weitestgehend mit den unter Hypoxie ermittelten Regulationen überein, auch wenn die Zellen eine zeitlich verschobene Reaktion zeigten. Die CYR61-mRNA wurde erst nach 24 h signifikant hochreguliert, die NOV-mRNA, nach leichter signifikanter Erhöhung nach 8 h, ebenfalls nach 24 h. Im Gegensatz dazu zeigte die CYR61- und NOV-Expression des intrazellulären Proteins bereits nach 4 h eine Hochregulation, gefolgt von einer Herunterregulation und erneutem Anstieg nach 24 h. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Translation der CYR61- und NOV-mRNA bereits vor 4 h abgeschlossen und daher keine Hochregulation der mRNA nach 4 h zu ermitteln war, sondern nur noch eine stark erhöhte intrazelluläre Protein-Expression. Die Ergebnisse weisen auf eine direkte Beteiligung von HIF-1 α an der Regulation der intrazellulären Protein-Expression von CYR61 und NOV hin. Diese Annahme konnte durch siRNA-Versuche, wodurch die Transkription des HIF-1 α -Proteins blockiert wurde, bestätigt werden. Der Knock-down von HIF-1 α unter Hypoxie konnte eine signifikante Abnahme der intrazellulären CYR61- und NOV-Expression aufzeigen, welches auf eine direkte Regulation der intrazellulären Protein-Expression der beiden CCN-Proteine durch HIF-1 α hinweist. Bereits Kunz et al. (2003) konnten zeigen, dass HIF-1 α an der transkriptionellen Regulation von CYR61 unter Hypoxie beteiligt ist. Aber weder die Sequenz von CYR61 noch die von NOV beinhaltet ein HRE-Motif in ihrer Promotor-Region. HIF-1 α scheint jedoch wichtig für

die Regulation von CYR61 zu sein, denn der CYR61-Promotor konnte in HIF-1 α negativen murinen embryonalen Fibroblasten nicht durch Hypoxie aktiviert werden (Kunz et al., 2003). Den Ergebnissen zufolge findet die hypoxische Regulation der intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine durch HIF-1 α statt. Es ist möglich, dass bei akuter Hypoxie, wenn eine schnelle Akkumulation des HIF-1 α -Proteins auftritt, die Expression der beiden CCN-Proteine durch HIF-1 α induziert wird, welches eine Akkumulation des intrazellulären Proteins zur Folge hat. Diese Akkumulation könnte als erste Reaktion der Zelle verstanden werden, mit der die Zelle auf akute Hypoxie reagiert. Die mögliche Beteiligung von hypoxisch-reguliertem CYR61 an der Trophoblastinvasion wird durch eine Studie von Lin et al. (2008) untermauert. Die Blockierung der HIF-1 α -Aktivität in CYR61-exprimierenden Magenkarzinom-Zellen inhibierte die Invasionsfähigkeit der Zellen, welches vermuten lässt, dass die Erhöhung des HIF-1 α -Proteins wichtig für die CYR61-vermittelte Invasion ist (Lin et al., 2008).

4.2.2.2 Die CYR61- und NOV-Sekretion wird durch Hypoxie, jedoch unabhängig von HIF-1 α , gesteuert

Die Untersuchung der Sekretion von CYR61 und NOV zeigte, wie bei der intrazellulären Expression, eine Erhöhung bei Kultivierung der JEG3-Zellen unter Hypoxie. Die Sekretion von CYR61 war jedoch über den gesamten Versuchszeitraum erhöht, wogegen die Sekretion von NOV erst langsam anstieg und nach 24 h signifikant erhöht war. Die Ergebnisse können durch Gashaw et al. (2008) bestätigt werden. Sie kultivierten endometriale HES-Zellen für bis zu 24 h unter Hypoxie und konnten eine Hochregulation der CYR61-Sekretion über die gesamte Versuchsspanne detektieren. Die Sekretion war bereits nach 1 h erhöht und zeigte eine maximal erhöhte signifikante Sekretion nach 2 h. Anschließend fiel die Sekretion ab, blieb jedoch bis zu 24 h signifikant erhöht (Gashaw et al., 2008).

Die Untersuchung der HIF-1 α -Beteiligung durch Versuche mit DMOG zeigte eine unterschiedliche Regulation der Sekretion im Vergleich zu der intrazellulären Protein-Expression auf. Während die Sekretion unter Hypoxie eindeutig und zudem signifikant erhöht war, zeigte die Ermittlung der Expressionslevel des sekretierten Proteins unter DMOG-Einfluss nur eine leichte bis zum Teil gar keine Erhöhung der Expressionswerte. Diese Tatsache könnte darauf hin deuten, dass die Sekretion von CYR61 und NOV möglicherweise unabhängig von HIF-1 α induziert wird. Die siRNA-Versuche, welche die Expression der

beiden CCN-Proteine bei verminderter Expression von HIF-1 α unter Hypoxie aufzeigen sollten, bestätigten die unter DMOG-Einfluss erzielten Ergebnisse. Die siRNA-Versuche zeigten, dass die Sekretion von CYR61 und NOV unabhängig von HIF-1 α reguliert zu sein scheint. Diese Ergebnisse weisen auf einen weiteren Signalweg hin, der die Sekretion von CYR61 und NOV unter Hypoxie im Trophoblasten regulieren muss.

Interessanterweise werden diese Ergebnisse zum Teil von einer Studie von Rimon und Kollegen (Rimon et al., 2008) unterstützt, welche die hypoxische Regulation von CTGF in Trophoblastzellen von reifen Plazenten untersucht haben. Sie konnten ebenfalls eine unterschiedliche Regulation des intrazellulären und des sekretierten Proteins nachweisen. Diese Gruppe kultivierte reife Trophoblastzellen mit 1% und 8% Sauerstoff und normalisierte die Expression zu den Sauerstoffbedingungen von 20% O₂. Die Hypoxie bewirkte eine Erhöhung der mRNA- und der sekretierten Protein-Expression von CTGF zeitabhängig mit einer signifikanten Hochregulation nach 16 h unter Hypoxie und einer maximalen Expression nach 72 h Inkubation. Das intrazelluläre CTGF-Protein zeigte keine Modulation in der Expression unter Einfluss von Hypoxie. Entgegen den Ergebnissen von Rimon et al. (2008) konnte in dieser Arbeit eine signifikante Hochregulation des intrazellulären CYR61- und NOV-Proteins nach 8 h unter Hypoxie nachgewiesen werden, während die Sekretion nach 24 h unter Hypoxie erhöht war.

Ist die Zelle einer länger anhaltenden Hypoxie ausgesetzt, so könnte diese die Sekretion der akkumulierten CYR61- und NOV-Proteine induzieren, welche eine Stimulation oder Inhibition der Migrations- und Invasionseigenschaften der Zelle hervorrufen könnte. Sowohl für CYR61 als auch für NOV konnte gezeigt werden, dass beide an der Induktion der Migration bei der Angiogenese beteiligt sind. CYR61 und NOV können beide die Migration von endothelialen Zellen *in vitro* erhöhen und die Neovaskularisierung in der Cornea *in vivo* induzieren (Babic et al., 1998; Lin CG et al., 2003).

Eine kürzlich erschienene Studie konnte einen anderen Signalweg für die hypoxische Regulation von CYR61 nachweisen, welcher unabhängig von HIF-1 α agiert. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Bindungsaffinität von CREB (*cyclic AMP-responsive element binding protein*) zu der CRE (*cyclic AMP-responsive element*) -Domäne in dem CYR61-Promotor erhöht und die vermehrte CYR61-Sekretion in Lymphomzellen induziert (Meyuhas et al., 2008). Es bleibt nachzuweisen, ob die Sekretion des CYR61-Proteins und

vielleicht auch des NOV-Proteins unter Hypoxie durch CREB in dem Trophoblastzell-System reguliert wird.

4.2.2.3 TGF- β 3 ist in die Regulation von CYR61 und NOV unter Hypoxie involviert

Die HIF-1 α -unabhängige, aber Hypoxie-abhängige Regulation der CYR61- und NOV-Sekretion rief die Frage auf, ob ein anderer Faktor in der Regulation der beiden sekretierten CCN-Proteine beteiligt ist. Daher wurde eine Beteiligung des Wachstumsfaktors TGF- β 3, der eine Rolle bei der Invasion des EVT in die Dezidua spielt und durch Hypoxie reguliert wird (Caniggia et al., 1999, 2000a, 2000b; Nishi et al., 2004), in diesem Prozess untersucht. Die unter Hypoxie inkubierten JEG3-Zellen zeigten eine Herunterregulation der intrazellulären CYR61-Protein-Expression nach 8 h zugunsten einer erhöhten signifikanten Sekretion des Proteins nach Behandlung mit rekombinantem TGF- β 3. Im Gegensatz zu der CYR61-Expression war das intrazelluläre NOV-Protein zu Beginn signifikant herunterreguliert und nach 24 h signifikant erhöht, wobei die Sekretion über die gesamte Versuchsspanne nur leicht erhöht war. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass TGF- β 3 und Hypoxie in einer synergistischen Reaktion die Sekretion von CYR61 erhöhen, da durch die Zugabe von rekombinantem TGF- β 3 die Expression unter Hypoxie nochmals erhöht wurde. TGF- β 3 scheint jedoch auf die Sekretion von NOV keinen Einfluß zu haben, da nur eine leichte, nicht signifikante Veränderung in der Expression nach Zugabe von rekombinantem TGF- β 3 zu erkennen war. Es ist bereits bekannt, dass der in der Präeklampsie herunterregulierte Faktor VEGF (Zhou et al., 2002) von TGF- β und Hypoxie in einer synergistischen Reaktion reguliert werden kann (Sánchez-Elsner et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Sánchez-Elsner konnte in hepatozellulären Karzinomzellen eine gesteigerte Sekretion von VEGF durch TGF- β unter 20% O₂ und zudem durch Hypoxie alleine nachweisen. Die kombinierte Inkubation der Zellen unter Hypoxie- und TGF- β -Einfluss konnte nochmals eine deutliche Steigerung der Sekretion im Vergleich zu der Sekretion unter TGF- β oder Hypoxie alleine hervorrufen (Sánchez-Elsner et al., 2001).

Neben der Beteiligung von TGF- β an der Sekretion von CYR61 weisen die Ergebnisse auch auf eine Beteiligung von TGF- β 3 an der Hypoxie vermittelten Hochregulation des intrazellulären CYR61- und NOV-Proteins hin. Es ist bereits bekannt, dass CTGF unter hypoxischen Bedingungen von Mitgliedern der TGF- β -Familie, vor allem TGF- β 1, reguliert

wird (Rimon et al., 2008) und durch die vWC-Domäne an TGF- β binden kann und dadurch die Aktivität von TGF- β erhöht (Chen CC und Lau, 2009). Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass CYR61 und auch NOV durch TGF- β -Faktoren in verschiedenen Zelltypen reguliert werden (Lafont et al., 2002, 2005; Bartholin et al., 2007). In humanen adrenokortikalen Zellen konnte eine Inhibition von NOV-Transkripten durch TGF- β 1 gezeigt werden, wobei die Signalweiterleitung durch den Transkriptionsfaktor c-Jun und MEKK1 und nicht durch die Smad-Proteine, welche üblicherweise durch TGF- β -Signale aktiviert werden, erfolgte (Lafont et al., 2002). Diese Studie konnte zum ersten Mal eine Inhibition eines CCN-Proteins durch Mitglieder der TGF- β -Familie, anstelle einer Induktion, zeigen. Eine andere Studie konnte eine gegenteilige Regulation von NOV in murinen Chondrozyten aufzeigen, jedoch für TGF- β 2. Durch exogene Zugabe von rekombinantem NOV-Protein wurden die mRNA-Level von TGF- β 2 hochreguliert, zudem konnte der Knock-down von NOV durch siRNAs eine Herunterregulation von TGF- β 2 bewirken. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe eine Inhibition von NOV durch TGF- β 1 in murinen Chondrozyten aufzeigen (Lafont et al., 2005). Bartholin et al. konnten eine transiente Hochregulation der CYR61- und CTGF-mRNA in humanen Hepatokarzinom- und Mammakarzinom-Zellen durch Zugabe von TGF- β ermitteln. Zudem zeigten mit Smad3 transfizierte Zellen eine erhöhte Stimulation der CYR61-Promotor-Aktivität, welche nochmals durch Transfektion mit allen drei, in der Signalweiterleitung von TGF- β involvierten, Smad-Proteinen (Smad 2, 3 und 4) gesteigert werden konnte. Sequenz-Analysen zeigten, dass der CYR61-Promotor sensitiv auf die Induktion von TGF- β -Signalen reagiert, da dieser drei funktionelle Smad-bindende Elemente enthält (Bartholin et al., 2007). Ob TGF- β 1 und TGF- β 2 in dem von uns untersuchten Trophoblast-System eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen.

Der Anstieg der intrazellulären Protein-Expression beider CCN-Proteine durch TGF- β 3 lässt die Frage zu, ob TGF- β 3 zusammen mit HIF-1 α die hypoxische Regulation von CYR61 und NOV vermittelt. Caniggia et al. (2000b) fanden heraus, dass TGF- β 3 parallel zu der HIF-1 α -Expression unter 3% O₂ in plazentaren Explants des ersten Trimesters exprimiert wird. Beide mRNA-Level waren unter niedrigen Sauerstoffbedingungen hochreguliert. Antisense-Inhibition der HIF-1 α -mRNA zeigte eine Herunterregulation der TGF- β 3-mRNA, welches die Arbeitsgruppe vermuten ließ, dass TGF- β 3 durch HIF-1 α in plazentaren Explants reguliert wird. Die Antisense-Inhibition von TGF- β 3 zeigte keine Herunterregulation von HIF-1 α , welches auf eine einseitige Regulation schließen ließ (Caniggia et al., 2000b). Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von HIF-1 α und TGF- β 3 in präeklampsischen Plazenten und Plazenten von normalen Schwangerschaften des gleichen Gestationsalters

(22. - 41. SSW). Sie konnten zunächst in beiden Gruppen eine Expression der TGF- β 3-mRNA nachweisen, jedoch war die mRNA-Expression in den präeklampsischen Plazenten im Vergleich zu den normalen Plazenten stark erhöht. Die Analyse der Protein-Expression zeigte, dass alle präeklampsischen Plazentaprobe HIF-1 α und TGF- β 3 exprimierten, wogegen keine der beiden Proteine in den Plazentaprobe der normalen Schwangerschaften zu finden waren. Dieses ließ den Schluss zu, dass die Expressionslevel der TGF- β 3-mRNA mit den Proteinleveln von HIF-1 α - korrelierten (Nishi et al., 2004). Zudem konnte eine Studie mit humanen primären dermalen Fibroblasten zeigen, dass die Hochregulation von CTGF über Hypoxie und HIF-1 α erfolgt, wobei diese Hochregulation zusätzlich durch TGF- β verstärkt wurde (Hong et al., 2006; Rimón et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte außerdem eine gegensätzliche Regulation von CYR61 und NOV- intrazelluläres versus sekretiertes Protein - nach Inkubation mit TGF- β 3 und Hypoxie festgestellt werden. Durch länger anhaltende Hypoxie (24 h) führte die Inkubation der Zellen mit TGF- β 3 zu einer Hochregulation der intrazellulären NOV- und sekretierten CYR61-Proteinlevel. Diese Erkenntnisse könnten darauf hindeuten, dass das intrazelluläre NOV stärker an der Wachstumsregulation der Trophoblastzellen beteiligt ist, welches durch vorhergehende Studien von Gellhaus et al. (2004), wie bereits unter 4.2.1 diskutiert wurde, bestätigt wird. Da aus den gegenwärtigen Ergebnissen hervorgeht, dass das sekretierte CYR61 durch TGF- β 3 und Hypoxie hochreguliert wird, scheint CYR61, im Gegensatz zu dem intrazellulären NOV, stärker in den Migrationsprozess von Trophoblastzellen involviert zu sein.

4.2.2.4 Einfluss von sekretiertem CYR61 und NOV auf die Trophoblastinvasion und mögliche Signalwege

Die Tatsache, dass CYR61 und NOV durch HIF-1 α und TGF- β 3 unter Hypoxie reguliert werden, weist auf eine Beteiligung der beiden CCN-Proteine an dem Invasionsvorgang des Trophoblasten hin. Während der frühen Schwangerschaft ist die HIF-1 α - und TGF- β 3-Expression erhöht (Caniggia et al., 2000b) und es ist bekannt, dass die Hypoxie essentiell für die Invasionsfähigkeit des Trophoblasten ist (Genbacev et al., 1996, 1997; Jauniaux et al., 2006). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die EVT-Zellen in den Zellsäulen von plazentaren Explants und in Matrigel invadierte EVT-Zellen eine Expression von CYR61 und NOV aufwiesen.

Eine maßgebliche Beteiligung von TGF- β 3 an der Trophoblastinvasion konnte bereits 1999 nachgewiesen werden (Caniggia et al., 1999). Die in preklamptischen plazentaren Explants nicht vorhandene Invasion der Trophoblastzellen konnte durch eine Inhibition von TGF- β 3 induziert werden, welches bedeutet, dass TGF- β 3 ein Inhibitor der Trophoblastinvasion zu sein scheint (Caniggia et al., 1999). Da TGF- β 3 die Trophoblastinvasion inhibiert und nicht induziert, ist es zunächst widersprüchlich, dass TGF- β 3 zwei vermeintlich Invasionsstimulierende Faktoren wie CYR61 und NOV reguliert. Die erzielten Ergebnisse scheinen zum Einen auf eine Beteiligung der beiden CCN-Proteine an der Trophoblastinvasion hinzuweisen, da sie in den invasiven EVT-Zellen der plazentaren Explants exprimiert werden und in den JEG3-Zellen durch Hypoxie hochreguliert sind. Zum Anderen werden CYR61 und NOV durch TGF- β 3 unter Hypoxie reguliert. Die Expression von TGF- β 3 ist zwischen der 6. und 8. SSW am höchsten und fällt anschließend ab der 9. SSW, zur Zeit der maximalen Trophoblastinvasion (Aplin et al., 1991), drastisch ab. Diese Herunterregulation korreliert mit dem Zeitpunkt der Trophoblast-Differenzierung, während dessen die Trophoblastzellen die Expression von Oberflächenmarkern hinsichtlich eines invasiven Phänotyps ändern. Zu dieser Umwandlung gehören u.a. die Änderung von Integrin-Isoformen (Bischof et al., 1993; Damsky et al., 1994; St.-Jacques et al., 1994) und die Hochregulation von MMPs (Librach et al., 1994). Die MMPs degradieren Moleküle der EZM, um eine Invasion der Trophoblastzellen bis tief in das plazentare Bett zu ermöglichen, wo diese die maternalen Spiralarterien umgestalten. Die Hochregulation der CYR61- und NOV-Expression könnte mit der Änderung der Oberflächenmoleküle der Trophoblastzellen korrelieren und Teil dieser zellbiologischen Veränderungen der Trophoblastzellen zu einem invasiven Phänotyp sein. Infolge der CYR61- und NOV-Akkumulation könnte die TGF- β 3-Expression nach erfolgreicher Induktion von CYR61 und NOV, als Vorbereitung des invasiven Phänotyps, abfallen.

Einen zusätzlichen Hinweis für die Beteiligung von CYR61 und NOV an der Trophoblastinvasion liefert die Tatsache, dass die sekretierten Formen von CYR61 und NOV in der Lage sind, durch die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_6\beta_1$ die Adhäsion und Migration von humanen Endothelzellen zu vermitteln (Babic et al., 1999; Leu et al., 2002; Ellis et al., 2003). Dieses sind die gleichen Integrine, welche in EVT-Zellen zu Beginn der Trophoblastinvasion exprimiert werden (Damsky et al., 1994). In humanen Fibroblasten kann CYR61 die Migration durch Bindung an $\alpha_v\beta_5$ stimulieren (Grzeszkiewicz et al., 2001) und NOV ist in der Lage durch $\alpha_5\beta_1$ die Adhäsion und Migration von humanen Endothelzellen zu vermitteln (Lin et al., 2003). Zudem kann CYR61 die Expression der EZM-Komponente Typ II Collagen bei der Chondrozyten-Differenzierung regulieren (Wong et al., 1997), welches auf eine

Beteiligung an der Regulation von EZM-Komponenten hinweist. Weiterhin kann die CYR61-Expression durch TGF- β , dessen Hauptaufgabe die Regulation der EZM-Synthese ist (Roberts et al., 1992), induziert werden (Bartholin et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass CYR61 durch TGF- β als negativer Mediator der EZM-Synthese wirkt und somit die Migration und Invasion von Zellen ermöglicht wird. Außerdem kann NOV mit dem EZM-assoziierten Glykoprotein Fibulin-1C interagieren (Perbal, 1999), welches an der Zelladhäsion beteiligt ist (Argraves et al., 1998). Ferner besitzen die CCN-Proteine eine Bindungsaffinität zu HSPGs, welche die Integrin-vermittelte Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion modifizieren können (Woods und Couchman, 1998). In humanen Fibroblasten und glatten Muskelzellen konnte nachgewiesen werden, dass die durch CYR61-induzierte Zell-Adhäsion durch das Integrin $\alpha_6\beta_1$ und HSPGs vermittelt wird (Chen et al., 2000; Grzeszkiewicz et al., 2002).

4.3 Einfluss von CYR61 und NOV in der Pathogenese der Präeklampsie

Die dargestellten Ergebnisse zeigen eine durch Hypoxie hervorgerufene Regulation von CYR61 und NOV in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters und in der invasiven Trophoblast-Zelllinie JEG3. In JEG3-Zellen konnte eine zusätzliche Beteiligung von HIF-1 α und TGF- β 3 bei der Regulation der beiden CCN-Proteine nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass CYR61 und NOV von HIF-1 α und TGF- β 3 unter Hypoxie reguliert werden, könnte auf ihre Beteiligung an der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie hinweisen. HIF-1 α und TGF- β 3 werden in präeklampsischen Plazenten erhöht exprimiert (Caniggia et al., 1999; Sun et al., 2006; Zamudio et al., 2007; Rajakumar et al., 2008) und scheinen somit eine Rolle bei dieser Erkrankung zu spielen.

Die mögliche Beteiligung von CYR61 und NOV bei der Entstehung der Präeklampsie wird zudem durch eine Studie über Trophoblast-Riesenzellen in präeklampsischen Plazenten unterstützt. Es konnte eine diffuse Färbung für CYR61 und NOV im Zytoplasma und Nukleus der präeklampsischen Plazenten nachgewiesen werden, im Gegensatz zu der starken punktuellen zytoplasmatischen Lokalisation und schwachen Expression im Nukleus der beiden CCN-Proteine in Trophoblast-Riesenzellen von gesunden Plazenten des gleichen Gestationsalters (Gellhaus et al., 2006). Diese Veränderung in der Lokalisation könnte ein Hinweis auf eine aktive Rolle von CYR61 und NOV in der Präeklampsie darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CYR61 und NOV Hypoxie induzierte Gene in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters und in der invasiven Trophoblast-Zelllinie JEG3 sind. In JEG3-Zellen werden beide CCN-Proteine durch HIF-1 α als auch von TGF- β 3 unter hypoxischen Bedingungen reguliert. Die hypoxische Regulation der CYR61- und NOV-Sekretion scheint jedoch durch einen anderen Signalweg zu erfolgen, welcher unabhängig von der Regulation des intrazellulären Proteins stattfindet. Die physiologischen Auswirkungen dieses hypoxischen Effekts auf die CYR61- und NOV-Expressionsstärke bedürfen weiterer Untersuchungen. Sie könnten möglicherweise einen tieferen Einblick in die Pathogenese der Präeklampsie ermöglichen hinsichtlich der beeinträchtigten Invasionsfähigkeit von Trophoblastzellen.

4.4 Ausblick

Inwieweit die Regulation der intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine von HIF-1 α und TGF- β 3 gesteuert wird könnte durch weiterführende Experimente geklärt werden. So könnte die antisense-Inhibition von HIF-1 α zusammen mit der antisense-Inhibition von TGF- β 3 Aufschluss über deren Beteiligung in der Regulation von CYR61 und NOV geben. Zudem könnte die Regulation der CYR61- und NOV-Expression unter Hypoxie mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation untersucht werden, damit zunächst der beteiligte Transkriptionsfaktor bzw. -komplex ermittelt werden kann. Anhand dessen könnte die Signalkaskade durch Ko-Immunpräzipitationen oder Inhibition bestimmter vermeintlich beteiligter Faktoren analysiert werden. Zu diesen Faktoren könnten z.B. die Smad-Proteine gehören, welche durch TGF- β induzierte Signale weiterleiten und durch Zusammenwirkung mit HIF-1 α die Hypoxie- und TGF- β -vermittelte Sekretion von VEGF induzieren können (Sánchez-Elsner et al., 2001).

Der Einfluss von CYR61 und NOV auf die Trophoblastinvasion könnte durch verschiedene weiterführende Experimente analysiert werden: (1) Inkubation von humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters mit rekombinantem CYR61 und/oder NOV um einen hohen Gehalt an sekretiertem Protein zu simulieren und die mögliche Veränderung der Invasionseigenschaften zu untersuchen; (2) Transfektion von plazentaren Explants mit siRNA gegen CYR61- und/oder NOV zur Untersuchung der Relevanz der beiden Faktoren; (3, 4) vergleichende Invasionsexperimente mit (3) stabilen JEG3-Transfektanten für CYR61 und/oder NOV, bzw. (4) mit CYR61- und/oder NOV siRNA transfizierten JEG3-Zellen in einem Matrigel-Invasionsassay.

5 Zusammenfassung

In der Plazenta-Entwicklung ist die Invasion von extravillösen Trophoblastzellen in das maternale Kompartiment, die Dezidua, Voraussetzung, um dem Embryo Zugang zum maternalen Blutkreislauf zu ermöglichen. Die Plazenta entwickelt sich zu Beginn der Schwangerschaft in einem hypoxischen Milieu, welches den Stimulus für die Invasion des Trophoblasten in die Dezidua darstellt. Die Trophoblastzellen migrieren in die maternalen Spiralarterien und bewirken eine Umgestaltung der Spiralarterien in Gefäße mit einem geringen Widerstand. Dieses führt zu einer erhöhten Durchflussleistung des Blutstroms, wodurch die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff garantiert wird. Diese Trophoblastinvasion ist in der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie gestört, welches zu einer Unterversorgung des Embryos und einer chronischen Hypoxie in der Plazenta führt. Da bei dieser Erkrankung die Migration des Trophoblasten betroffen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation der CCN-Proteine CYR61 (CCN1) und NOV (CCN3) untersucht, die eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen zu spielen scheinen. Diese matrizellulären Proteine sind in die Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen involviert, zu denen u.a. die Angiogenese, Migration, Invasion, Proliferation und Differenzierung gehören. Da bekannt ist, dass beide Moleküle in der Plazenta exprimiert werden und in der Präeklampsie dereguliert sind, wurde die Regulation und Lokalisation von CYR61 und NOV in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters und in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3, als Modell für den invasiven Trophoblasten, unter verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke Expression von CYR61 und NOV in invadierenden extravillösen Trophoblastzellen, kultiviert unter 3% O₂, beobachtet werden. Zudem wurde ein signifikanter Anstieg der Expression der beiden Proteine unter geringen Sauerstoffbedingungen von 3% O₂ im Vergleich zu 8% O₂, der physiologischen Sauerstoffkonzentration der reifen Plazenta, und 20% O₂, der *in vitro* Standard-Kulturbedingung, nachgewiesen.

In JEG3-Trophoblastzellen konnte eine signifikante Hochregulation der intrazellulären Protein-Expression und der Sekretion von CYR61 und NOV unter hypoxischen Bedingungen von 1% O₂ im Vergleich zur Expression unter 20% O₂ nachgewiesen werden, welches mit einer Stabilisierung des Hypoxie induzierten Faktors (HIF)-1 α korrelierte. Die Beteiligung von HIF-1 α an der Regulation von CYR61 und NOV wurde zum Einen durch Behandlung der JEG3-Zellen mit DMOG (Dimethyloxalylglyzin), welches die Stabilisierung des HIF-1 α Proteins unter 20% O₂ simuliert, und zum Anderen durch ein Knock-down der HIF-1 α -

Expression unter Hypoxie mittels siRNAs untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass nur der Anstieg der intrazellulären Protein-Expression von CYR61 und NOV von HIF-1 α abhängig ist, jedoch nicht die Sekretion der beiden Proteine. Außerdem konnte eine Beteiligung von TGF- β 3, einem wichtigen Faktor bei der Trophoblastinvasion, bei der Erhöhung der intrazellulären CYR61- und NOV-Proteine sowie der Sekretion von CYR61 unter Hypoxie ermittelt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Expression der intrazellulären und der sekretierten CYR61- und NOV-Proteine unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen durch zwei Signalwege reguliert wird. Die Regulation der intrazellulären CCN-Proteine scheint durch Hypoxie und HIF-1 α zu erfolgen, wogegen die Sekretion durch eine Kombination aus Hypoxie und TGF- β 3 reguliert zu sein scheint. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass eine Störung in der Expression von CYR61 und NOV an der maternalen-fötalen Schnittstelle, hervorgerufen durch eine Unterversorgung an Sauerstoff, eine Ursache für die unzureichende Invasion des Trophoblasten in dem Krankheitsbild der Präeklampsie sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Abe M, Sato Y (2001)** cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 289-298
- Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, Krättschmar J, Haendler B, Schütze N, Regidor PA, Winterhager E (2004)** Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 10, 399-407
- Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V (2002)** How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 101, 6-14
- Ando N, Hirahara F, Fukushima J, Kawamoto S, Okuda K, Funabashi T, Gorai I, Minaguchi H (1998)** Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 40, 48-56
- Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC (2000)** The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nature Genet* 25, 311-314
- Aplin JD (1991)** Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99, 681-692
- Argraves WS, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E (1989)** Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor-beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* 58, 623-629
- Arnholdt H, Meisel F, Fandrey K, Lohrs U (1991)** Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60, 365-372
- Ayer-Lelievre C, Brigstock D, Lau L, Pennica D, Perbal B, Yeger H (2001)** Report and abstracts on the first international workshop on the CCN family of genes. *Mol Pathol* 54, 105-120
- Baader E, Tschank G, Baringhaus KH, Burghard H, Günzler V (1994)** Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues. *Biochem J* 300, 525-530
- Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1998)** CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6355-6360
- Babic AM, Chen CC, Lau LF (1999)** Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin α V β 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 2958-2966

- Ball DK, Rachfal AW, Kemper SA, Brigstock DR (2003)** The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *J Endocrinol* 176, 1-7
- Bartholin L, Wessner LL, Chirgwin JM, Guise TA (2007)** The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells. *Cancer Lett* 246, 230-236
- Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y & Fisher SJ (1994)** Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 164, 550–561
- Benveniste R, Speeg KV Jr, Long A, Rabinowitz D (1978)** Concanavalin-A stimulates human chorionic gonadotropin (hCG) and hCG-alpha secretion by human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 84, 1082-1087
- Benveniste R, Scommenga A (1981)** In “Placenta; Receptors, Pathology and Toxicology” (R. K. Miller, H. A. Thiede, Eds.), p. 241. W. B. Saunders, London
- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ (2001)** The rest is silence. *RNA* 7, 1509-1521
- Bischof P, Redard M, Gindre P, Vassilakos P, Campana A (1993)** Localization of alpha 2, alpha 5 and alpha 6 integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 51, 217-226
- Bork P (1993)** The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327, 125-130
- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000)** The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75, 2227-2240
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991)** Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114, 1285-1294
- Brigstock DR (1999)** The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 20, 189-206
- Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1970)** The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1, 177-191
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA (2002)** The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 187, 1416-1423
- Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, van Assche A, Moutquin JM (2001)** The classification and diagnosis of hypertensive disorder of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 20, 20–30

- Bruegge K, Jelkmann W, Metzen E (2007)** Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF- α hydroxylases. *Curr Med Chem* 14, 1853–1862
- Burt DW, Paton IR (1992)** Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biol* 11, 497–510
- Burt DW, Law AS (1994)** Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 5, 99–118
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ (1999)** Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 103, 1641–1650
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M (2000a)** Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 105, 577–587
- Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M (2000b)** Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 21 (Suppl A), S25–30
- Caniggia I, Winter JL, Adriana and Luisa Castellucci Award lecture (2002)** hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies—a review. *Placenta* 23 (Suppl A), S47–S57.
- Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, VanDorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P, Thurnau G (1998)** Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 338, 701–705
- Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzoni D, Cinti S, Bischof P (2000)** Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 6, 951–958
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000)** Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275, 25130–25138
- Chaour B, Goppelt-Struebe M (2006)** Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J* 273, 3639–3649
- Cartwright JE, Keogh RJ, Tissot van Patot MC (2007)** Hypoxia and placental remodelling. *Adv Exp Med Biol* 618, 113–126
- Chen CC, Mo FE, Lau LF (2001a)** The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 47329–47337
- Chen CC, Chen N, Lau LF (2001b)** The angiogenic factors Cyr61 and CTGF induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 10443–10452

- Chen CC, Young JL, Monzon RI, Chen N, Todorovic V, Lau LF (2007)** Cytotoxicity of TNF α is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *EMBO J* 26, 1257–1267
- Chen CC, Lau LF (2009)** Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 771–783
- Chen CP, Chen CY, Yang YC, Su TH, Chen H (2004)** Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta* 25, 413–421
- Chen N, Chen CC, Lau LF (2000)** Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin α 6 β 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 275, 24953–24961
- Chen N, Leu SJ, Todorovic V, Lam SC, Lau LF (2004)** Identification of a novel integrin α 3 β 3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 279, 44166–44176
- Chen PS, Wang MY, Wu SN, Su JL, Hong CC, Chuang SE, Chen MW, Hua KT, Wu YL, Cha ST, Babu MS, Chen CN, Lee PH, Chang KJ, Kuo ML (2007)** CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α 3 β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J Cell Sci* 120, 2053–2065
- Chen Y, Du XY (2007)** Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J Cell Biochem* 100, 1337–1345
- Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, Laurent M, Alami J, Schofield PN, Perbal B (1998)** novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. *Am J Pathol* 152, 1563–1575
- Chien W, Kumagai T, Miller CW, Desmond JC, Frank JM, Said JW, Koeffler HP (2004)** Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *J Biol Chem* 279, 53087–53096
- Chun D, Braga C, Chow C, Lok L (1964)** Clinical observations on some aspects of hydatidiform moles. *J Obstet Gynecol Br Commonw* 71, 180–184
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000)** Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275, 25733–25741
- Cooker LA, Peterson D, Rambow J, Riser ML, Riser RE, Najmabadi F, Brigstock D, Riser BL (2007)** TNF- α , but not IFN- γ , regulates CCN2 (CTGF), collagen type I, and proliferation in mesangial cells: possible roles in the progression of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, 157–165
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ (1992)** Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 89, 210–222
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ (1994)** Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120, 3657–3666

- Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Brigstock DR, Courty J, Overall CM (2007)** Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol* 27, 8454-8465
- de Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG (2001)** Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 7, 401-407
- Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A (2000)** Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 6, 480-487
- Dekker G, Sibai B (2001)** Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet* 357, 209-215
- Dekker G, Robillard PY (2003)** The birth interval hypothesis—does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis? *J Reprod Immunol* 59, 245-251
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, Moses HL, Chen EY (1988)** A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7, 3737-3743
- Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Canovas F, Charbord P, Noël D, Jorgensen C (2007)** Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 9, 33
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A (2000)** Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 156, 2185-2199
- Einarsson JI, Sangi-Hagheykar H, Gardner NO (2003)** Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 188, 1241-1243
- Ellis PD, Metcalfe JC, Hyvonen M, Kemp PR (2003)** Adhesion of endothelial cells to NOV is mediated by the integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$. *J Vasc Res* 40, 234-243
- Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleadle JM (2006)** Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1 α , HIF-2 α , and other pathways. *J Biol Chem* 281, 15215-15226
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001)** C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54
- Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M (2006)** Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 71, 642-651

- Fisher SJ (2004)** The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 53
- Fitzpatrick TE, Graham C (1998)** Stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in immortalized human trophoblast cells cultured under low levels of oxygen. *Exp Cell Res* 245, 155–162
- Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J (2005)** The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 65, 4690–4697
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004)** CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279, 36943–36950
- Fujikura T, Yoshida J (1996)** Blood gas analysis of placental and uterine blood during cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 87, 133–136
- Gao R, Brigstock DR (2003)** Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 37, 214–220
- Gao R, Brigstock DR (2004)** Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 279, 8848–8855
- Gashaw I, Hastings JM, Jackson K, Winterhager E, Fazleabas AT (2006)** Induced endometriosis in the baboon (*Papio anubis*) increases the expression of the proangiogenic factor CYR61 (CCN1) in eutopic and ectopic endometria. *Biol Reprod* 74, 1060–1066
- Gashaw I, Stiller S, Böing C, Kimmig R, Winterhager E (2008)** Premenstrual regulation of the pro-angiogenic factor CYR61 in human endometrium. *Endocrinology* 149, 2261–2269
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E (2004)** Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 279, 36931–36942
- Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, Lye SJ, Kimmig R, Winterhager E (2006)** Decreased expression of the angiogenic regulators CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) in human placenta is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 12, 389–399
- Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, Lye SJ, Winterhager E (2007)** The circulating proangiogenic factors CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) are significantly decreased in placenta and sera of preeclamptic patients. *Reprod Sci* 14 (8 Suppl), 46–52
- Genbacev O, Schubach SA, Miller RK (1992)** Villous culture of first trimester human placenta-model to study extravillous trophoblast (EVT) differentiation. *Placenta* 13, 439–461

- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ (1996)** Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 97, 540-550
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997)** Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669-1672
- Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002)** Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3-19
- Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD (1981)** Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to preeclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88, 876-881
- Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ (1995)** Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* 268, 1362-1368
- Glukhova L, Angevin E, Lavialle C, Cadot B, Terrier-Lacombe MJ, Perbal B, Bernheim A, Goguel AF (2001)** Patterns of specific genomic alterations associated with poor prognosis in high-grade renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 130, 105-110
- Graham CH, Fitzpatrick TE, McCrae KR (1998)** Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. *Blood* 91, 3300-3307
- Graham CH, Postovit LM, Park H, Canning MT, Fitzpatrick TE (2000)** Role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion. *Placenta* 21, 443-450
- Henry Gray (2004)** Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition, C.V. Mosby, ISBN 0-443-07168-3
- Grosfeld A, Andre J, Hauguel-de Mouzon S, Berra E, Pouyssegur J, Guerre-Millo M (2002)** Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J Biol Chem* 277, 42953-42957
- Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R (2005)** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 8, 147-156
- Grümmer R (1991)** Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung zellbiologischer Mechanismen der Invasion des menschlichen Trophoblasten. Experimentelle Untersuchungen unter Verwendung von Chorionkarzinomzellsphäroiden und Endometrium-Organokultur. Dissertation, RTWH Aachen
- Grümmer R, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW (1994)** Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta* 15, 411-429
- Grümmer R, Donner A, Winterhager E (1999)** Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta* 20, 547-553
- Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF (2001)** CYR61 stimulates human skin fibroblasts migration through integrin $\alpha_v\beta_5$ and enhances mitogenesis through integrin $\alpha_v\beta_3$, independent of its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 276, 21943-21950

- Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SCT, Lau LF (2002)** The angiogenic factor CYR61 supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin $\alpha_6\beta_1$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 143, 1441–1450
- Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR (2001)** Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol* 54, 293-299
- Gupta R, Hong D, Iborra F, Sarno S, Enver T (2007)** NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science* 316, 590-593
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952
- Hammacher A, Thompson EW, Williams ED (2005)** Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 442-450
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000)** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296
- Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B (2003)** Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem* 270, 3408-3421
- Handwerger S, Freemark M (2000)** The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13, 343-356
- Harris AL (2002)** Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47
- Heath E, Tahri D, Andermarcher E, Schofield P, Fleming S, Boulter CA (2008)** Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene. *BMC Dev Biol* 8, 18
- Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ (2002)** Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277, 26351-26355
- Hirschfeld M, zur Hausen A, Bettendorf H, Jäger M, Stickeler E (2009)** Alternative splicing of Cyr61 is regulated by hypoxia and significantly changed in breast cancer. *Cancer Res* 69, 2082–2090
- Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hiouth J, Lindheimer MD, MacPherson C (2002)** Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparous. *Am J Obstet Gynecol* 186, 422–426
- Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS (2006)** Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 146, 362-370

- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996)** Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α -subunit. *J Biol Chem* 271, 32253–32259
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998)** Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin–proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7987–7992
- Irving JA, Lala PK (1995a)** Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- β , IGF-II and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 217, 419–427
- Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VH, Lala PK (1995b)** Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus villous explants and propagated in culture. *Placenta* 16, 413–433
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001)** Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472
- James JL, Stone PR, Chamley LW (2004)** The effect of hypoxia on extravillous trophoblast outgrowth in a quantitative two-dimensional explant model. *Placenta* 25, 17
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ (2000)** Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157, 2111–2122
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ (2006)** Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 12, 747–755
- Jay P, Berge-LeFranc L, Marsollier C, Mejean S, Taviaux S, Berta P (1997)** The human growth factor-inducible immediate early gene, *Cyr61*, maps to chromosome 1p. *Oncogene* 14, 1753–1757
- Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC (1999)** Activation-dependent adhesion of human platelets to *Cyr61* and *Fisp12*/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem* 274, 24321–24327
- Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B (1992)** Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (*nov*) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol* 12, 10–21
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J (1995)** Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Gen* 11, 415–421
- Katsube K, Chuai ML, Liu YC, Kabasawa Y, Takagi M, Perbal B, Sakamoto K (2001)** The expression of chicken *NOV*, a member of the *CCN* gene family, in early stage development. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1, 61–65
- Katsube K, Sakamoto K, Tamamura Y, Yamaguchi A (2009)** Role of *CCN*, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev Growth Differ* 51, 55–67

- Kaufmann P, Burton GJ (1994)** Anatomy and genesis of the placenta. In Knobil E and Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn. Raven Press, New York, USA, 441–484
- Kenneth NS, Rocha S (2008)** Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J* 414, 19–29
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986)** Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational-age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93, 1049–1059
- Kibschull M, Gellhaus A, Winterhager E (2008)** Analogous and unique functions of connexins in mouse and human placental development. *Placenta* 29, 848–854
- Kim SM, Park JH, Chung SK, Kim JY, Hwang HY, Chung KC, Jo I, Park SI, Nam JH (2004)** Cocksackievirus B3 infection induces cyp61 activation via JNK to mediate cell death. *J Virol* 78, 13479–13488
- Kireeva ML, MO FE, Yang GP, Lau LF (1996)** Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* 16, 1326–1334
- Kireeva ML, Lam SCT, Lau LF (1998)** Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin $\alpha_v\beta_3$. *J Biol Chem* 273, 3090–3096
- Kocialkowski S, Yeger H, Kingdom J, Perbal B, Schofield PN (2001)** Expression of the human NOV gene in first trimester fetal tissues. *Anat Embryol (Berl)* 203, 417–427
- Kohler PO, Bridson WE (1971)** Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 32, 683–687
- Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ (2000)** Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60, 883–887
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R (1990)** A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220–223
- Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC (1996)** Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1534–1542
- Krieglstein K, Rufer M, Suter-Crazzolara C, Unsicker K (1995)** Neural functions of the transforming growth factors b. *Int J Dev Neurosci* 13, 301–315
- Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM (2000)** Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nature Med* 6, 1335–1340
- Kunz M, Moeller S, Koczan D, Lorenz P, Wenger RH, Glocker MO, Thiesen HJ, Gross G, Ibrahim SM (2003)** Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor CYR61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 278, 45651–45660

- Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol MA (1995)** Fetal fibronectin levels are elevated in maternal plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 172, 649–653
- Kupferminc MJ (2003)** Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 111
- Lafont J, Laurent M, Thibout H, Lallemand F, Le Bouc Y, Atfi A, Martinerie C (2002)** The expression of novH in adrenocortical cells is down-regulated by TGFbeta 1 through c-Jun in a Smad-independent manner. *J Biol Chem* 277, 41220–41229
- Lafont J, Jacques C, Le Dreau G, Calhabeu F, Thibout H, Dubois C, Berenbaum F, Laurent M, Martinerie C (2005)** New target genes for NOV/CCN3 in chondrocytes: TGF-beta2 and type X collagen. *J Bone Miner Res* 20, 2213–2223
- Lal A, Peters H, St Croix B, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ (2001)** Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 93, 1337–1343
- Lam C, Lim KH, Karumanchi SA (2005)** Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* 46, 1077–1085
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002)** FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466–1471
- Latinkic BV, Mo FE, Greenspan JA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ross SR, Lau LF (2001)** Promoter function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing, and role of the serum response element. *Endocrinology* 142, 2549–2557
- Lau LF, Nathans D (1985)** Identification of a set of genes expressed during G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J* 4, 3145–3151
- Lau LF, Lam SC (1999)** The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 248, 44–57
- Leiser R, Kaufmann P (1994)** Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 102, 122–134
- Leu SJ, Lam SC, Lau LF (2002)** Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alpha6beta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 46248–46255
- Leu SJ, Liu Y, Chen N, Chen CC, Lam SC, Lau LF (2003)** Identification of a novel integrin alpha 6 beta 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). *J Biol Chem* 278, 33801–33808
- Leu SJ, Chen N, Chen CC, Todorovic V, Bai T, Juric V, Liu Y, Yan G, Lam SC, Lau LF (2004)** Targeted mutagenesis of the angiogenic protein CCN1 (CYR61). Selective inactivation of integrin alpha6beta1-heparan sulphate proteoglycan coreceptor-mediated cellular functions. *J Biol Chem* 279, 44177–44187

- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group (2006)** Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355, 992-1005
- Li CL, Martinez V, He B, Lombet A, Perbal B (2002)** A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling. *Mol Pathol* 55, 250-261
- Liang Y, Li C, Guzman VM, Evinger AJ 3rd, Protzman CE, Krauss AH, Woodward DF (2003)** Comparison of prostaglandin F₂alpha, bimatoprost (prostanamide), and butaprost (EP2 agonist) on Cyr61 and connective tissue growth factor gene expression. *J Biol Chem* 278, 27267-27277
- Librach CI, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui T, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ (1994)** Interleukin-1 β regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem* 269, 17125-17131
- Lin CG, Leu SJ, Chen N, Tebeau CM, Lin SX, Yeung CY, Lau LF (2003)** CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J Biol Chem* 278, 24200-24208
- Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM, Lau LF (2005)** Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. *J Biol Chem* 280, 8229-8237
- Lin MT, Chang CC, Lin BR, Yang HY, Chu CY, Wu MH, Kuo ML (2007)** Elevated expression of Cyr61 enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells through integrin α 2 β 1. *J Biol Chem* 282, 34594-34604
- Lin MT, Kuo IH, Chang CC, Chu CY, Chen HY, Lin BR, Sureshbabu M, Shih HJ, Kuo ML (2008)** Involvement of hypoxia-inducing factor-1 α -dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion. *J Biol Chem* 283, 15807-15815
- Loregger T, Pollheimer J, Knöfler M (2003)** Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast – a review. *Placenta* 24 (Suppl A), 104-110
- Luo Z, Li H, Zhang J, Zhang H, Xiu R (2006)** Effects of human connective tissue growth factor gene transfection on migration of human umbilical vein endothelial cell. *Clin Hemorheol Microcirc* 34, 185-192
- Lunell N-O, Nylund LE, Lewander R, Sarby B (1982)** Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia. Measurements with indium- 113m and a computer-linked gamma camera. *Clin Exp Hypertens B* 1, 105
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F (2007)** Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 6
- Lyall F, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A, Robson SC (2001)** Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol* 158, 1713-1721

- MacLaughlan SD, Palomino WA, Mo B, Lewis TD, Lininger RA, Lessey BA (2007)** Endometrial expression of Cyr61: a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. *Obstet Gynecol* 110, 146-154
- MacPhee DJ, Mostachfi H, Han R, Lye SJ, Post M, Caniggia I (2001)** Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development. *Lab Invest* 81, 1469-1483
- Madisen L, Webb NR, Rose TM, Marquardt H, Ikeda T, Twardzik D, Seyedin S, Purchio AF (1988)** Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* 7, 1-8
- Maillard M, Cadot B, Ball RY, Sethia K, Edwards DR, Perbal B, Tatoud R (2001)** Differential expression of the *ccn3* (nov) proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues. *Mol Pathol* 54, 275-280
- Manara MC, Perbal B, Benini S, Strammiello R, Cerisano V, Perdichizzi S, Serra M, Astolfi A, Bertoni F, Alami J, Yeger H, Picci P, Scotlandi K (2002)** The expression of *ccn3*(nov) gene in musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 160, 849-859
- Martinerie C, Viegas-Pequignot E, Guenard I, Dutrillaux B, Nguyen VC, Bernheim A, Perbal B (1992)** Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene* 7, 2529-2534
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000)** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309
- Massague J, Gomis RR (2006)** The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580, 2811-2820
- Matijevic R, Meekins JW, Walkinshaw SA, Neilson JP, McFadyen IR (1995)** Spiral artery blood flow in the central and peripheral areas of the placental bed in the second trimester. *Obstet Gynecol* 86, 289-292
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999)** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275
- Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA (2008)** Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 59, 61-78
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003)** Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111, 649-658
- McCaig D, Lyall F (2009)** Hypoxia Upregulates GCM1 in Human Placenta Explants. *Hypertens Pregnancy*, 1-16 [Epub ahead of print]
- McMaster MT, Zhou Y, Fisher SJ (2004)** Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. *Semin Nephrol* 24, 540-547

- Meyuhas R, Pikarsky E, Tavor E, Klar A, Abramovitch R, Hochman J, Lago TG, Honigman A (2008)** A Key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in Tumor cells. *Mol Cancer Res* 6, 1397-1409
- Minamizato T, Sakamoto K, Liu T, Kokubo H, Katsube K, Perbal B, Nakamura S, Yamaguchi A (2007)** CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 567-573
- Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF (2002)** CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol* 22, 8709-8720
- Moffett-King A (2002)** Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2, 656-663
- Moodley J, Ramsaroop R (1989)** Placental bed morphology in black women with eclampsia. *S Afr Med J* 75, 376-378
- Myatt L (2002)** Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine* 19, 103-111
- Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y (2004)** Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 145, 4838-4845
- Nakamura SI, Kawai T, Kamakura T, Ookura T (2009)** TGF-beta3 is expressed in taste buds and inhibits proliferation of primary cultured taste epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* [Epub ahead of print]
- Nathan C, Sporn M (1991)** Cytokines in context. *J Cell Biol* 113, 981-986
- Nishi H, Nakada T, Hokamura M, Osakabe Y, Itokazu O, Huang LE, Isaka K (2004)** Hypoxia-inducible factor-1 transactivates transforming growth factor-beta3 in trophoblast. *Endocrinology* 145, 4113-4118
- Ober WB (1987)** Pathology of trophoblastic diseases. *Hum Reprod* 2, 143-152
- O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990)** Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10, 3569-3577
- O'Brien TE, Ray JG, Chan WS (2003)** Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology* 14, 368-374
- Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massague J (1987)** Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329, 539-541
- O'Kelly J, Chung A, Lemp N, Chumakova K, Yin D, Wang HJ, Said J, Gui D, Miller CW, Karlan BY, Koeffler HP (2008)** Functional domains of CCN1 (Cyr61) regulate breast cancer progression. *Int J Oncol* 33, 59-67

- Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D (2009)** Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 28, 523-532
- Parisi MS, Gaggero E, Rydziel S, Canalis E (2006)** Expression and regulation of CCN genes in murine osteoblasts. *Bone* 38, 671-677
- Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Watanabe C, Cohen RL, Melhem MF, Finley GG, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Gurney AL, Botstein D, Levine AJ (1998)** WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14717-14722
- Perbal B (1999)** Nuclear localisation of NOVH protein: a potential role for NOV in the regulation of gene expression. *Mol Pathol* 52, 84-91
- Perbal B (2001)** NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol* 54, 57-79
- Planque N, Perbal B (2003)** A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis. *Cancer Cell Int* 3, 15
- Perbal B (2004)** CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62-64
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004)** A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83-94
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P (1999)** Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13, 2105-2124
- Prabhakar NR (2001)** Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 90, 1986-1994
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles WV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MWJ, Doetschman T (1995)** Transforming growth factor-b3 is required for secondary palate fusion. *Nat Gen* 11, 409-414
- Quan T, He T, Shao Y, Lin L, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2006)** Elevated cysteine-rich 61 mediates aberrant collagen homeostasis in chronologically aged and photoaged human skin. *Am J Pathol* 169, 482-90
- Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP (2001)** Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 α , in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 64, 499 -506
- Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP (2008)** Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 29, 290-299
- Redline RW, Patterson P (1995)** Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 26, 594-600

- Redman CW, Sargent IL (2005)** Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592-1594
- Rimon E, Chen B, Shanks AL, Nelson DM, Sadovsky Y (2008)** Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor. *Endocrinology* 149, 2952-2958
- Roberts AB, Sporn MB (1989)** Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF- β . *Am Rev Respir Dis* 140, 1126–1128
- Roberts AB, Sporn MB (1990)** The transforming growth factor- β s. Springer Verlag, Heidelberg, Handbook of Experimental Pharmacology 95, 419–472
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E (1992)** Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283-285
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998)** HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17, 3005–3015
- Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, Martz KL, Ewell MG, Morris CD, Sibai BM (2003)** Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. *Am J Epidemiol* 157, 1108-1114
- Sakamoto K, Yamaguchi S, Ando R, Miyawaki A, Kabasawa Y, Takagi M, Li CL, Perbal B, Katsube K (2002)** The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 29399-29405
- Salceda S, Caro J (1997)** Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin–proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redoxinduced changes. *J Biol Chem* 272, 22642–22647
- Sampath D, Winneker RC, Zhang Z (2001a)** Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 β -estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology* 142, 2540-2548
- Sampath D, Zhu Y, Winneker RC, Zhang Z (2001b)** Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 β -estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1707-1715
- Sampath D, Winneker RC, Zhang Z (2002)** The angiogenic factor Cyr61 is induced by the progestin R5020 and is necessary for mammary adenocarcinoma cell growth. *Endocrine* 18, 147-159
- Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbí A, Attisano L, Bernabéu C (2001)** Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 276, 38527-38535
- Sanguanserm Sri D, Pongcharoen S (2008)** Pregnancy immunology: decidual immune cells. *Asian Pac J Allergy Immunol* 26, 171-181

- Schaaps JP, Tsatsaris V, Goffin F, Brichant JF, Delbecq K, Tebache M, Collignon L, Retz MC, Foidart JM (2005)** Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularization. *Am J Obstet Gynecol* 192, 323-332
- Schmidt M, Dogan C, Birdir C, Callies R, Kuhn U, Gellhaus A, Janetzko A, Kimmig R, Kasimir-Bauer S (2007a)** Altered angiogenesis in preeclampsia: evaluation of a new test system for measuring placental growth factor. *Clin Chem Lab Med* 45, 1504-1510
- Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, Ye RD, Lau LF, Lam SC (2002)** Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* 99, 4457-4465
- Schober JM, Lau LF, Ugarova TP, Lam SC (2003)** Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 278, 25808-25815
- Schreiber J, Riethmacher-Sonnenberg E, Riethmacher D, Tuerk EE, Enderich J, Bosl MR, Wegner M (2000)** Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa. *Molec Cell Biol* 20, 2466-2474
- Schuppan D, Ocker M (2003)** Integrin-mediated control of cell growth. *Hepatology* 38, 289-291
- Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hüfner M, Köhrle J, Jakob F (1998)** The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. *Endocrinology* 139, 1761-1770
- Schütze N, Schenk R, Fiedler J, Mattes T, Jakob F, Brenner RE (2007)** CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells. *BMC Cell Biol* 8, 45
- Sedmak JJ, Grossberg SE (1977)** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79, 544-552
- Semenza GL (2000)** Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 59, 47-53
- Semenza GL (2003)** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732
- Shih IeM, Kurman RJ (2002)** Molecular basis of gestational trophoblastic diseases. *Curr Mol Med* 2, 1-12
- Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Kanyama M, Kuboki T, Tamatani T, Tezuka K, Takemura M, Matsumura T, Takigawa M (1999)** Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. *J Biochem* 126, 137-45

- Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H (2003)** Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res* 290, 370–380
- Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS (1997)** Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 18, 657–665
- Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He TC (2006)** CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26, 2955–2964
- Sibai BM (2002)** Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 100, 369–377
- Sibai BM (2003)** Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 102, 181–192
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005)** Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785–799
- Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J (2008)** The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol* 217, 809–818
- Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I (2005)** Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4299–4308
- Söhl G, Willecke K (2004)** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228–232
- Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A, Caro J (2001)** Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* 276, 21995–21998
- Steinberg G, Khankin EV, Karumanchi SA (2009)** Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res* 123 (Suppl 2), 93–99
- Stepan H, Jank A (2009)** Angiogenic factors and their role in pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Z Geburtshilfe Neonatol* 213, 101–105
- St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M (1994)** Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 51, 405–413
- Strickland S, Richards WG (1992)** Invasion of the trophoblast. *Cell* 71, 355–357
- Su BY, Cai WQ, Zhang CG, Su HC, Perbal B (1998)** A developmental study of novH gene expression in human central nervous system. *C R Acad Sci III* 321, 883–892

- Sun SG, Shen N, Zheng YH, Shang T (2006)** Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and sFlt-1 in preeclampsia placenta. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 41, 440-444
- Tamura I, Rosenbloom J, Macarak E, Chaqour B (2001)** Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, 1524-1532
- Tan TW, Lai CH, Huang CY, Yang WH, Chen HT, Hsu HC, Fong YC, Tang CH (2009)** CTGF enhances migration and MMP-13 up-regulation via α 5 β 3 integrin, FAK, ERK, and NF- κ B-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Biochem* 107, 345-356
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000)** Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel–Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 19, 4298–4309
- Todorovic V, Chen C-C, Hay N, Lau LF (2005)** The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 171, 559–568
- Tong X, Xie D, O’Kelly J, Miller CW, Muller-Tidow C, Koeffler HP (2001)** Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non-small-cell lung cancer. *J Biol Chem* 276, 47709–47714
- Tong X, O’Kelly J, Xie D, Mori A, Lemp N, McKenna R, Miller CW, Koeffler HP (2004)** Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the betacatenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene* 23, 4847–4855
- van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, Büller HR (1999)** High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 180 (5), 1146-50
- Vatten LJ, Skjaerven R (2004)** Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG* 111, 298-302
- Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ (2001)** Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98, 296-302
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D’Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006)** Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12, 862
- Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA (2002)** Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. *Lancet* 359, 673–674
- Wang A, Rana S, Karumanchi SA (2009)** Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 4, 147-158
- Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC (2004)** Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 191, 254–258

- WHO (2005)** World Health Report: Make Every Mother and Child Count. Geneva: World Health Org
- Wiedmaier N, Muller S, Koberle M, Manncke B, Krejci J, Autenrieth IB, Bohn E (2008)** Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner. *Int J Med Microbiol* 298, 231–243
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G (2002)** Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383, 725–737
- Woods A, Couchman JR (1998)** Syndecans: Synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol* 8, 189–192
- Wu MY, Hill CS (2009)** Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16, 329–343
- Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ (2000)** Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel–Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* 19, 6297–6305
- Xie D, Miller CW, O'Kelly J, Nakachi K, Sakashita A, Said JW, Gornbein J, Koeffler HP (2001)** Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J Biol Chem* 276, 14187–14194
- Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA (2003)** Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost* 1, 1642–1654
- Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP (2006)** Integrin alphaDbeta2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood* 107, 1643–1650
- Yamada KM, Pankov R, Cukierman E (2003)** Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* 36, 959–966
- Yang GP, Lau LF (1991)** Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* 2, 351–357
- Yinon Y, Nevo O, Xu J, Many A, Rolfo A, Todros T, Post M, Caniggia I (2008)** Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels: hypoxic regulation via transforming growth factor-beta 3. *Am J Pathol* 172, 77–85
- Zagórska A, Dulak J (2004)** HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 51, 563–585
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000)** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33
- Zamudio S, Wu Y, Ietta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, Post M, Illsley NP, Caniggia I (2007)** Human placental hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *Am J Pathol* 170, 2171–2179

- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ (1993)** Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91, 950–960
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997a)** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 99, 2139–2151
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ (1997b)** Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 99, 2152–2164
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ (2002)** Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 160, 1405–1423

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	adaptor-related protein complex-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	basic fibroblast growth factor
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim
BMP	bone morphogenic protein
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine
CCN	CYR61/CTGF/NOV
CD34 ⁺	cluster of differentiation 34 ⁺
cDNA	complementary DNA
CRE	cyclic AMP-responsive element
CREB	cyclic AMP-responsive element binding protein
CT	Carboxy-terminal
CTGF	connective tissue growth factor
Cx43	Connexin43
CYR61	cysteine-rich 61
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindole Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethyloxalylglyzin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
E _{Probe}	Extinktion der Probe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-related kinase
EVT	extravillöser Trophoblast
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	focal adhesion
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
Fe(II)	Eisen(II)
fg	Femtogramm
GCM1	glial cells missing 1
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
hCG	human chorionic gonadotropin
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hg	Quecksilber
HIF	hypoxia inducible factor
HLA	human leukocyte antigen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hPL	human placental lactogen
HPLC-H ₂ O	High Pressure Liquid Chromatography-H ₂ O
HRE	hypoxia responsive element
HRP	horseradish peroxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IHC	Immunhistochemie
IL-1	interleukin-1
IUGR	intrauterine growth restriction
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
IZC	Immunzytochemie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere

MAPK	mitogen activated protein kinase
MAV-1	myeloblastosis associated virus-1
MEKK1	mitogen-activated/extra cellular response kinase kinase 1
MEM	minimum essential medium
min	Minute
mM	Millimolar
MMLV RT	moloney murine leukemia virus reverse transkriptase
MMPs	Matrix-Metallo-Proteinasen
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NK	natural killer
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	Amino-terminal
NOV	nephroblastoma overexpressed
Novdel3 ^{-/-}	Deletion des Exon 3 im NOV-Gen
O ₂	Sauerstoff
OCT	Optimal Cutting Temperature™
ODD	oxygen-dependent degradation domain
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Präeklampsie
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PHD	Prolylhydroxylase
PLGF	placental growth factor
Pro	Prolin
pVHL	von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Protein
RAC-1	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
RGD	Arg–Gly–Asp
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
s	Sekunde

SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sEng	soluble endoglin
sFlt1	soluble FMS-related tyrosine kinase 1
siRNA	short interfering RNA
Smad	mothers against decapentaplegic homolog
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
T β R-I	signal transducing type I receptor
T β R-II	ligand-binding type II receptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
Tie-2	tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF factor homology domains 1
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TSP-1	thrombospondin type I repeat
uPA	urokinase-type plasminogen activator
üN	über Nacht
U	Unit
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWC	von Willebrand factor type C repeat
WB	Western Blot
WHO	world health organisation
WISP	Wnt-induced secreted protein
Wnt	wingless-type murine mammary tumor virus integration site family
x g	-fache Erdbeschleunigung

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1	Aufbau der humanen Plazenta.	2
Abb. 1.2	Schema der Trophoblastinvasion.	3
Abb. 1.3	Schema der Trophoblastinvasion in der normalen (A) und der präeklampsischen Plazenta (B).	7
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des plazentaren Explant Modells.	8
Abb. 1.5	Schema der CCN-Protein-Struktur und der CYR61- und NOV-Bindungspartner.	11
Abb. 1.6	Regulation der HIF-1 α -Protein-Stabilität.	17
Abb. 3.1	Makroskopische Darstellung der humanen plazentaren Explants.	45

Abb. 3.2	Mikroskopische Darstellung des humanen plazentaren Explantmodells.	46
Abb. 3.3	Lokalisation von CYR61 und NOV im humanen plazentaren Explantmodell.	47
Abb. 3.4	Lokalisation des CYR61 und NOV Proteins in humanen plazentaren Explants des ersten Trimesters.	48
Abb. 3.5	Vergleichende Regulation von CYR61 und NOV in plazentaren Explants des ersten Trimesters unter 3% O ₂ im Vergleich zu 20% O ₂ .	49
Abb. 3.6	Regulation von CYR61 und NOV in plazentaren Explants des ersten Trimesters unter 3% O ₂ im Vergleich zu dem physiologischem Sauerstoffgehalt in der reifen Plazenta (8% O ₂).	50
Abb. 3.7	Lokalisation von CYR61 und NOV in JEG3-Zellen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.	52
Abb. 3.8	Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins und Expression von VEGF-A unter Hypoxie.	53
Abb. 3.9	Anstieg der CYR61-Expression unter hypoxischen Bedingungen.	55
Abb. 3.10	Anstieg der NOV-Expression unter hypoxischen Bedingungen.	56
Abb. 3.11	Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins mit Hilfe des PHD2-Inhibitors DMOG.	57
Abb. 3.12	Die CYR61-Expression wird durch die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins reguliert.	59
Abb. 3.13	Die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins durch DMOG induziert die Hochregulation von NOV.	60
Abb. 3.14	Silencing von HIF-1 α in JEG3-Zellen mit Hilfe von siRNAs.	62
Abb. 3.15	HIF-1 α -abhängige Regulation der CYR61-Expression in JEG3-Zellen.	63
Abb. 3.16	HIF-1 α -abhängige Regulation der NOV-Expression in JEG3-Zellen.	64
Abb. 3.17	Anstieg der TGF- β 3-Expression unter Einfluss von Hypoxie.	66
Abb. 3.18	Einfluss von TGF- β 3 auf die hypoxische Regulation von CYR61 in JEG3-Zellen.	67
Abb. 3.19	Beteiligung von TGF- β 3 an der hypoxischen Regulation von NOV in JEG3-Zellen.	68

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Primäre Antikörper.	25
Tab. 2.2	Sekundäre Antikörper.	25
Tab. 2.3	Charakteristika der verwendeten Oligonukleotide	26

8 Danksagung

Frau Prof. Dr. Winterhager danke ich für die interessante Themenstellung, die fachliche und freundliche Unterstützung und für die ständige Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen Kongressen, auf denen ich meine Arbeit präsentieren konnte, und für die Ermöglichung und Unterstützung bei der Beantragung des Auslandsstipendiums.

Bei Frau Dr. Alexandra Gellhaus möchte ich mich für die intensive fachliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die aufmunternden Worte während meiner gesamten Promotionszeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stephen Lye danke ich für die lehrreiche und unvergessliche Zeit in seinem Labor im Mount Sinai Hospital in Toronto, Kanada. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Caroline Dunk, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in ihrem Zuhause als willkommener Gast empfangen hat. Ich bedanke mich auch bei den vielen anderen Mitarbeitern für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellungen.

Frau Dr. Stilla Frede und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Joachim Fandrey danke ich für die Benutzung des Hypoxie-Brutschrankes und der Hilfestellungen bzgl. Fragen zur Hypoxie.

Peter Babioch, Dave Kittel und Sigfried Moyrer danke ich für die Hilfe in allen Computerfragen und insbesondere Peter Babioch für die Hilfe bei Problemen mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop.

Ich danke Claudine Kühn, Eva Kusch, Georgia Rauter, Gabriele Sehn, Ulla Schmücker und Ulrike Tlodka dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank geht an alle meine Arbeitskollegen für eine wunderschöne und unvergessliche Zeit. Ich möchte mich besonders bei meinen Mitstreitern Betina van Fürden, Verena Mönckediek und Jessica Wagener bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir durch so manche Krisen hindurch geholfen haben. Außerdem danke ich Frau Dr. Isabella Gashaw, Frau Dr. Alexandra Gellhaus, Melanie Gemein, Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer, Kathrin Katzuschke, Yvonne Koch, Carolin Sannecke und allen medizinischen Doktoranden für die unvergesslichen Stunden im Labor und die lustigen, netten Stunden nach der Arbeit.

Ich möchte mich bei meinen Freunden, vor allem bei Michaela und Dirk, für die aufmunternden Gespräche bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und Ronja, die mir immer liebevoll zur Seite standen und es immer wieder geschafft haben, mich aufzumuntern.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meinen Mann, der mir immer geduldig und interessiert zugehört hat und mir immer über jeden Tiefpunkt hinweg geholfen hat. Danke für deine liebevolle Unterstützung und deine unermüdlichen Motivationen.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG: Wi 774/22-1) gefördert.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Nadine Wolf geb. Göbel
 Moselstr. 31
 46049 Oberhausen
 Mobil: 0177-3829802
 E-Mail: n.wolf@wcv-mail.de
 Geburtsdatum: 12.06.1981
 Geburtsort: Oberhausen
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung

08/1987 – 06/1991	Concordia Grundschule, Oberhausen
08/1991 – 06/2000	Elsa-Brändström-Gymnasium, Oberhausen

Hochschulausbildung

10/2000 – 07/2001	Studiengang Architektur, Universität Dortmund
10/2001 – 05/2006	Studiengang Biologie, Universität Düsseldorf
12/2003	Vordiplom Biologie
08/2005	Praktikum Immunologie, Bayer Health Care, Wuppertal
03/2006	Praktikumsbetreuung Molekularpathologie
05/2006	Diplom Biologie
08/2006 – 10/2009	Promotion Molekularbiologie
10/2006 – heute	Wissenschaftliche Betreuung von Doktoranden, Diplomanden und Studenten
06/2007, 05/2009	Mitarbeit bei der Durchführung der „4 th und 5 th International Conference on the Female Reproductive Tract“, 2007 und 2009, Frauenchiemsee, Deutschland

Auslandsaufenthalt und Weiterbildungen

10/2006	Workshop: „Wissenschaftliche Präsentation“, Herbstakademie, Universität Duisburg-Essen
10/2008 – 11/2008	Laborpraktikum, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Kanada (Stipendium des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes e. V.)

03/2009	Workshop: "English for Presentation and Conferences", Zentrum für Hochschul- und Qualitätsentwicklung, Universität Duisburg-Essen
---------	---

Ehrenamtliche Tätigkeiten

09/1999	Wahlhelfer der Stadt Oberhausen
---------	---------------------------------

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	sehr gute Englischkenntnisse Grundkenntnisse Französisch
Computerkenntnisse	MS Office, Adobe Photoshop, Corel Draw, SPSS
Wissenschaftliche Methoden	RT-PCR, quantitative Real-time PCR, SDS-PAGE, Western Blot, ELISA, Zellkultur, Primärgewebekultur, Transfektion, siRNA-Assays, Immunzytochemie, Immunhistochemie
Mitgliedschaft	Deutsche Krebsgesellschaft e.V.

Essen, den 14.10.2009

Nadine Wolf

10 Erklärung**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Hypoxische Regulation der matrizellulären CCN-Proteine CYR61 (CCN1) und NOV (CCN3) durch HIF-1 α und TGF- β 3 im humanen Trophoblasten*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nadine Wolf befürworte.

Essen, den 14.10.2009

Prof. Dr. E. Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 14.10.2009

Nadine Wolf

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 14.10.2009

Nadine Wolf